

METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN EL HIGADO

P O R

COLECCIÓN DE MONOGRAFÍAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

MONOGRAFÍAS PUBLICADAS

LA ARGINASA HEPÁTICA
por Dr. Julio Cabello R.

METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS
por Dr. Mario Plaza de los Reyes.

METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN EL HÍGADO.
por Dr. Hermann Niemeyer.

EN PREPARACIÓN

LOS BOCIOS
por Dr. Arturo Atria R.

EL PROBLEMA ALIMENTARIO
por Dr. Jorge Mardones.

Dr. HERMANN NIEMEYER

Jefe de Laboratorio en el Instituto de Química Fisiológica y Patológica de la Universidad de Chile. Profesor de Bioquímica de la Escuela Universitaria de Enfermeras del Servicio Nacional de Salud.



02796



UNIVERSIDAD DE CHILE
SANTIAGO, 1955

*(Del Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile. Director: Prof. Dr. Eduardo Cruz Coke).*

Es propiedad del autor
Inscripción N.º 17260

CORTESIA DEL CENTRO DE
PUBLICACIONES BIOLOGICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
CASILLA 12967 - SANTIAGO-CHILE

SANTIAGO DE CHILE
IMPRENTA UNIVERSITARIA
VALENZUELA BASTERRICA Y CÍA. LTDA.
1955

A MI MAESTRO

PROFESOR EDUARDO CRUZ COKE L.

HOMENAJE A SU LABOR CREADORA DE 30 AÑOS EN
LA CÁTEDRA DE QUÍMICA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA.

PROLOGO

En el curso de los últimos años ha sido motivo de mi preocupación preferente el estudio de ciertos aspectos del metabolismo glucídico en cortes de hígado de rata. Las investigaciones que constituyeron mi tesis de grado dejaron planteados algunos problemas que han sido objeto de trabajos posteriores, los que han conducido al conocimiento de nuevos hechos. Su interpretación ha exigido recurrir a nuevas hipótesis de trabajo, por cuanto ellos no podían explicarse satisfactoriamente de acuerdo con los conocimientos de que se disponía con respecto al metabolismo de los hidratos de carbono. La presente monografía tiene por finalidad exponer en forma detallada el conjunto de estas investigaciones. La mayoría de los datos experimentales han sido ya publicados; sin embargo, hemos agregado experimentos cuando pareció necesario alcanzar un mayor grado de seguridad en las conclusiones. Los resultados de otros experimentos aparecen por primera vez en esta monografía.

La presentación en conjunto de este material permite una mejor visión global de los asuntos tratados, a la vez que da ocasión para realizar una discusión más amplia de los resultados experimentales, tanto nuestros como de otros investigadores. Ambas cosas son difíciles de hacer en la presentación parcial de los trabajos a medida que se va completando cada etapa de su desarrollo. Más aún, en la discusión final me he tomado la libertad de especular sobre los datos experimentales disponibles y avanzar así las hipótesis de trabajo que guían las nuevas investigaciones destinadas a someter a prueba la tesis sustentada.

La necesidad de disponer de conocimientos frescos sobre diversos aspectos del metabolismo glucídico para que el lector pueda apreciar críticamente los resultados expuestos, dió origen a la inclusión de dos capítulos: uno se refiere a la importancia del hígado en el metabolismo general de los hidratos de carbono, y el otro resume los conocimientos actuales sobre el llamado metabolismo intermedio de los glúcidos. La escasez de publicaciones en español acerca de estas materias, constituyó un incentivo más para realizar esta labor adicional. El resumen no pretende abarcar todos los aspectos posibles del metabolismo hidrocarbonado, sino que se ha limitado

a los hechos esenciales que tienen conexión directa con los datos experimentales proporcionados en los capítulos siguientes, complementándolos ocasionalmente con los conocimientos necesarios para dar una visión armónica del conjunto. Se trata pues sólo de un esquema básico referente a la degradación y síntesis de los diversos hidratos de carbono, y por eso en las referencias hemos considerado casi exclusivamente los datos que conciernen al hígado como objeto de investigación.

Si bien el grueso del trabajo experimental ha sido realizado en el Instituto de Química Fisiológica y Patológica, una parte de él fué ejecutado en el Departamento de Bioquímica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard, dirigido por el Prof. A. B. Hastings, donde tuve el privilegio de trabajar como becario de la Fundación Guggenheim. Cúmpleme expresar aquí mis agradecimientos al profesor Hastings por su cordial hospitalidad.

Las últimas etapas de este trabajo han sido parcialmente financiadas con una asignación del fondo Williams-Waterman de la Research Corporation.

No podría, en este momento, dejar de expresar mi reconocimiento a la labor creadora del Profesor Dr. Eduardo Cruz Coke, quien ha sabido estimular en sus discípulos el anhelo de perfeccionamiento en la búsqueda científica, con la abnegación y el desinterés de un verdadero maestro. También quisiera en esta oportunidad hacer llegar mis agradecimientos a todo el personal del Instituto de Química Fisiológica y Patológica por su constructiva crítica durante la elaboración de este trabajo, y muy especialmente al Dr. Enrique Figueroa, quien ha sido colaborador permanente en su realización experimental, y a la señorita Carmen González, que ha participado activamente en sus últimas etapas.

Ha comprometido mi gratitud el Profesor Dr. Jorge Mardones R., quien con generosidad ejemplar ha participado en la discusión y en la preparación de esta monografía. Vayan también mis agradecimientos al señor Héctor Valenzuela, por la revisión del original cuidando de la propiedad del lenguaje; a la señora Delia González y a la señorita Lilian Lightfoot, encargadas de la preparación de los manuscritos para la imprenta; a la señorita Elsa Rivera, quien dibujó los gráficos, y a mi esposa María Marié de Niemeyer, bibliotecaria en la Biblioteca Central de la Escuela de Medicina, por su colaboración en la confección de la bibliografía.

H. N.

INDICE

	Págs.
PROLOGO.....	9
CAPÍTULO 1.—INTRODUCCION.....	13
CAPÍTULO 2.—FUNCION DEL HIGADO EN EL METABOLISMO GLUCIDICO.	
2. 1. Generalidades.....	19
2. 2. El Hígado como fuente de la glucosa sanguínea.....	20
2. 3. Relación entre glicemia y glicógeno hepático.	21
2. 4. Formación de glicógeno y glucosa a partir de otras hexosas.	22
2. 5. Formación de glicógeno y glucosa a partir de metabolitos intermedios	23
2. 6. Formación de glicógeno y glucosa a partir de proteínas	25
2. 7. Formación de glicógeno y glucosa a partir de lípidos.	27
2. 8. Formación de grasas a partir de hidratos de carbono.....	28
2. 9. Influencia del hígado sobre la utilización de glucosa en otros tejidos	29
CAPÍTULO 3.—METABOLISMO INTERMEDIO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.	
3. 1. Generalidades.....	31
3. 2. Fosforilación inicial de las hexosas.....	31
3. 3. Formación y destrucción del glicógeno.....	32
3. 4. Conversión de fructosa y galactosa en glucosa y glicógeno.	37
3. 5. Vía glicolítica de Embden-Meyerhof.	39
3. 6. Vía oxidativa de Warburg-Dickens-Lipmann	44
3. 7. Importancia relativa de las vías glicolítica y oxidativa.....	49
3. 8. Ciclo cítrico de Krebs	50
3. 9. Formación de glucosa y glicógeno a expensas de metabolitos intermedios.....	58
3. 10. Interconversión de glúcidos, lípidos y prótidos.....	61
CAPÍTULO 4.—INFLUENCIA DE METABOLITOS GLUCIDICOS EN LA RESPIRACION DEL HIGADO.	
4. 1. Generalidades.....	65
4. 2. Influencia de la glucosa.....	65

	Págs.
4. 3. Influencia de la fructosa	72
4. 4. Influencia de los hexosafosfatos.....	73
4. 5. Influencia del piruvato y de otros metabolitos	75
4. 6. Discusión.....	75
CAPÍTULO 5.—INFLUENCIA DE METABOLITOS GLUCIDICOS SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO EN EL HIGADO.	
5. 1. Generalidades.....	79
5. 2. Producción de ácido láctico en ausencia de sustrato.....	79
5. 3. Influencia de la glucosa	81
5. 4. Influencia de la fructosa	83
5. 5. Influencia de los hexosafosfatos.....	84
5. 6. Influencia del ácido pirúvico.....	84
5. 7. Producción de ácido láctico en el líquido donde se han incubado cortes de hígado.....	86
5. 8. Discusión.....	87
CAPÍTULO 6.—RELACION DE HEXOSAS Y HEXOSAFOSFATOS CON EL GLICOGENO HEPATICO.	
6. 1. Generalidades.....	91
6. 2. Alteraciones del equilibrio iónico en cortes de tejido	91
6. 3. Evolución del glicógeno en ausencia de sustrato	94
6. 4. Influencia de la glucosa	101
6. 5. Influencia de la fructosa	103
6. 6. Influencia de los hexosafosfatos.....	104
6. 7. Estudio comparativo del efecto de diversos sustratos	104
6. 8. Influencia de la adición simultánea de glucosa y de hexosamono-fosfatos.....	106
6. 9. Discusión.....	107
CAPÍTULO 7.—ACTIVIDAD GLUCOSA-6-FOSFATASICA DEL HIGADO.	
7. 1. Liberación de fosfato inorgánico a expensas de hexosafosfatos.	109
7. 2. Difusibilidad de la glucosa-6-fosfatasa.	110
7. 3. Influencia de la glucosa sobre la desfosforilación del glucosa-6-fosfato.....	112
7. 4. Discusión.....	113
CAPÍTULO 8.—INFLUENCIA DE ALGUNOS FARMACOS EN EL METABOLISMO HIDROCARBONADO.	
8. 1. Influencia de la floricina.....	117
8. 2. Influencia del Dinitrofenol	121
8. 3. Influencia del Aldehído glicérico y del sorbosafosfato.....	134
CAPÍTULO 9.—DISCUSION GENERAL.....	
REFERENCIAS.....	141
	151

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1. 1. El punto de partida de los estudios fisiológicos que tienen relación con el metabolismo glucídico, se encuentra indudablemente en los trabajos de Claude Bernard sobre el azúcar de la sangre y el que se deposita en forma de glicógeno en el hígado. Mering y Minkowsky dieron un fuerte impulso a la investigación del metabolismo de los hidratos de carbono, cuando consiguieron demostrar que la extirpación del páncreas produce en los perros un síndrome en todo semejante a la diabetes mellitus del hombre. Estos experimentos permitieron comprender mejor la naturaleza de la enfermedad humana, y llevaron posteriormente al descubrimiento de la insulina, hormona pancreática que juega un papel preponderante en la regulación del metabolismo glucídico. No es extraño, por esto, que la mayoría de los estudios sobre el metabolismo hidrocarbonado haya estado ligada al estudio de la diabetes experimental.

Paralelamente a la adquisición de los conocimientos sobre el origen y el destino de los glúcidos en el organismo pluricelular, otros investigadores estudiaban la acción de los microorganismos sobre los hidratos de carbono. En el curso de esta clase de estudios, Pasteur logró establecer las nociones fundamentales acerca de la fermentación de la glucosa producida por las levaduras. La investigación en este campo fué fructífera y señaló el comienzo de una rama muy importante de la Bioquímica, la Enzimología, que estudia la acción de los catalizadores biológicos en las reacciones que constituyen el metabolismo intermedio. Comenzaron así las investigaciones referentes a las reacciones químicas que ocurren en el interior de las células, durante la utilización de los azúcares y de las demás sustancias constitutivas de los alimentos. De esta manera se crearon las bases para el estudio bioquímico del metabolismo intermedio de

los hidratos de carbono, conjuntamente a lo que pudiéramos llamar el estudio fisiológico de su destino en el ser pluricelular.

Alrededor de 1920, algunos investigadores emprendieron la tarea de aplicar los conocimientos y los métodos adquiridos en el estudio de los microorganismos, a la investigación del metabolismo intermedio de los glúcidos en los tejidos animales. Los primeros estudios se realizaron principalmente en el músculo, llegándose, en el curso de 10 a 15 años, a establecer un esquema bastante completo de las etapas intermedias por las cuales pasa la molécula de glucosa durante el proceso de formación de glicógeno, de ácido láctico o de anhídrido carbónico y agua. Numerosos laboratorios han contribuido al perfeccionamiento de estos esquemas referentes al músculo, así como también a las más variadas clases de tejidos y células, incluyendo vegetales. En el curso de estas investigaciones, se ha llegado al convencimiento de que los procesos fundamentales del metabolismo intermedio son muy semejantes en toda la materia viva. Difieren, eso sí, en el grado de importancia que las distintas vías metabólicas tienen en los diversos tipos de células, en relación con las funciones específicas que ellas cumplen.

1. 2. Los métodos utilizados en estas investigaciones son muy diversos: se han empleado tejidos y células intactas, esto es, en condiciones semejantes a las que ocurren en el organismo entero, así como papillas de tejidos y extractos en diversos grados de purificación, que permiten un análisis más preciso de las reacciones individuales en estudio. En numerosas ocasiones se ha alcanzado el objetivo fundamental que persigue el bioquímico, que consiste en aislar completamente una determinada reacción, obteniendo en estado puro el fermento que la cataliza y estableciendo con la mayor precisión posible las condiciones cinéticas de su actividad.

Por el camino analítico, la bioquímica ha logrado desentrañar la intimidad de gran número de las reacciones que ocurren durante el metabolismo intermedio de los glúcidos. Para completar este conocimiento, es necesario averiguar qué importancia relativa tienen en cada tejido intacto las reacciones y vías metabólicas encontradas por medio del método analítico. El hecho de que en una célula exista un determinado fermento, no es una prueba de que la reacción por él catalizada sea cuantitativamente importante para la actividad de esa célula. Del mismo modo, el estudio de la cinética de una reacción aislada no basta para llegar a conocer el sentido y

la velocidad que ella tiene en el conjunto metabólico de la célula íntegra. Nos parece pertinente citar lo que a este respecto dicen Soskin y Levine (1950, pág. 65): «La aspiración de todo químico « especializado en fermentos, consiste en aislar alguno de los innumerables sistemas catalíticos y purificarlo, conocer sus propiedades químicas y estudiar las reacciones por él catalizadas *in vitro*, en un medio homogéneo. Esta forma analítica de ver el problema y de proceder en consecuencia ha proporcionado, y nos continuará proporcionando, una gran cantidad de datos que enriquecen nuestro conocimiento sobre la maquinaria metabólica celular, pero que tienen el inconveniente de referirse sólo a detalles sobre las propiedades de sus componentes. Sin embargo, no debemos olvidar que, como en todo sistema bien organizado, la simple suma de las partes no representa las propiedades del sistema en su totalidad. En la célula viva, que no es un sistema homogéneo, la tensión superficial, la interdependencia entre diversos sistemas enzimáticos y otras muchas influencias, pueden interferir en la actividad de ciertos sistemas catalíticos y promover la puesta en marcha de otros».

También Guzmán Barrón (1943) expresa puntos de vista semejantes: «Una vez que han sido aislados los diferentes sistemas enzimáticos, que han sido determinados su cinética y su constante de equilibrio, que ha sido establecida su distribución a través de los reinos vivos y que han sido estudiadas sus interrelaciones, todavía permanece la tarea de verificar si estas actividades químicas ocurren de la misma manera en las células vivas que en estas soluciones».

Es entonces útil tratar de establecer de qué manera funcionan, en el tejido intacto, las reacciones encadenadas que constituyen el metabolismo intermedio, para disponer así de una visión mejor de la fisiología y de la bioquímica del tejido. Es decir, parece necesario volver un poco atrás, de vez en cuando, para reconsiderar los conocimientos analíticos adquiridos y estudiar de nuevo los fenómenos bioquímicos, con las técnicas que el estudio analítico abandonó por considerarlas insuficientes para los fines buscados. Con el objeto de satisfacer esta necesidad, hemos estudiado en cortes de hígado de rata, el efecto que producen algunas hexosas y sus correspondientes ésteres fosfóricos, sobre la respiración del tejido, sobre la formación de glicógeno y sobre la producción de ácido láctico. Hemos tratado de ver cómo se cumple, en estas condiciones experi-

mentales, la previsión que podría hacerse de acuerdo con los esquemas metabólicos contruídos con los hechos proporcionados por el método analítico.

1. 3. El estudio del metabolismo en cortes de tejido, introducido por Warburg hace cerca de 30 años, ha sido muy provechoso para aclarar diversos aspectos de la fisiología celular. En esta preparación, la mayor parte de las células están conservadas, aunque experimentan algunas alteraciones, debidas posiblemente a cambios osmóticos, que ocurren aun cuando el medio de incubación tiene una composición salina que se asemeja a la de los líquidos extracelulares. Se ha observado un escape de potasio desde el interior de las células hacia el medio circundante, escape que parece asociarse con las alteraciones celulares y que podría ocasionar modificaciones más o menos importantes en el metabolismo. Por este motivo, se han ideado soluciones salinas con mayor contenido de potasio y de otros cationes intracelulares, que han resultado mejores para mantener el medio intracelular en condiciones iónicas más cercanas a las fisiológicas. Es posible que nunca se consiga obtener dentro de las células un ambiente igual al que existe en un órgano *in situ*, pero en todo caso se puede pensar que en los cortes de tejidos, las relaciones espaciales que guardan entre sí los diversos sistemas enzimáticos son más normales que las que ocurren en papillas o en extractos. Por lo tanto, los experimentos realizados en cortes de tejido pueden informar mejor sobre el comportamiento fisiológico de las células. Son muchos los ejemplos que muestran la similitud de las características metabólicas reveladas en estudios realizados en cortes de tejidos y en órganos *in situ*. El estudio en cortes de tejidos tiene la ventaja de ser más sencillo; permite, además, proporcionar con facilidad diversas sustancias a las células y analizar los productos resultantes de su metabolismo. Con este procedimiento, por otra parte, se pueden realizar estudios comparativos, ya que es posible colocar en condiciones experimentales diferentes, cortes provenientes de un mismo órgano.

Todas estas razones han determinado que se hayan elegido las técnicas que utilizan cortes de hígado para estudiar las relaciones recíprocas que existen entre las distintas reacciones que constituyen el metabolismo intermedio. Así, estos procedimientos son utilizados por diversos investigadores que están estudiando cuál de las dos vías fundamentales de degradación de los hidratos de car-

bono, la glicolítica o la oxidativa, tiene preferencia en cada tejido. Estos métodos resultan también muy adecuados para estudiar la influencia que ejercen los factores hormonales en el metabolismo intermedio. Se comprende la necesidad de recurrir a tales procedimientos en este caso, pues se trata de investigar los cambios en la velocidad de ciertas reacciones que ocurren en sistemas organizados. En cortes de tejido se está investigando, por ejemplo, cuál es la influencia que la insulina y las hormonas suprarrenales e hipofisarias ejercen sobre el metabolismo glucídico del hígado, considerado independientemente y en sus relaciones con el metabolismo lipídico y proteico. También en cortes de hígado se ha estudiado la función reguladora de la glicogenólisis, que ejercen la adrenalina y el factor hiperglicemiante-glicogenolítico del páncreas.

1. 4. El presente trabajo fué motivado por la observación de que la glucosa agregada al medio en el que se incuban cortes de hígado, no modifica el consumo de oxígeno del tejido, ni aun en aquellas condiciones en las que se supone que el efecto de dilución del glicógeno preexistente está reducido al mínimo. Se trató de averiguar cuál es la etapa limitativa en la oxidación de la glucosa. Con este objeto se estudió la influencia que ejercen sobre la respiración de los cortes de hígado, diversos hexosafosfatos, aceptados como intermedios en el proceso de degradación de la glucosa. Se llegó así a demostrar que el glucosa-6-fosfato, sustancia que es considerada como el primer producto intermedio en el camino de utilización de la glucosa, incrementa el consumo de oxígeno en forma manifiesta. Esta observación permitía afirmar que la reacción catalizada por la glucoquinasa es la limitativa en la oxidación de la glucosa. Sin embargo, al estudiar la síntesis del glicógeno, pudo observarse que la glucosa produce una mayor formación del polisacárido que el glucosa-6-fosfato, hecho que aparecía como un contrasentido, ya que según el esquema clásico, si el impedimento en la degradación de la glucosa reside en la reacción inicial, debe manifestarse también en otros aspectos de la utilización del azúcar. Cuando se compara el comportamiento de la fructosa con el de los hexofosfatos, se aprecia que, si bien el incremento de la respiración es muy semejante, la fructosa es mucho más eficiente en la formación de glicógeno. Estos hechos experimentales han sugerido la hipótesis de que la síntesis de glicógeno no se realiza en forma principal de acuerdo con el esquema que considera al glucosa-6-fosfato y al glucosa-1-fosfato como etapas intermedias, sino que por otra vía, en que éstos no

participan. Es muy posible que las reacciones catalizadas por la fosfoglucomutasa y por la fosforilasa, que *in vitro* han demostrado ser reversibles, en la célula intacta se desarrollen preferentemente en el sentido de la degradación del glicógeno. Como se discutirá en el cuerpo de este trabajo, los resultados obtenidos hasta el momento proporcionan argumentos indirectos que favorecen la hipótesis planteada.

CAPÍTULO 2

FUNCION DEL HIGADO EN EL METABOLISMO GLUCIDICO

2. 1. Desde los trabajos de Claude Bernard, se sabe que el hígado desempeña un papel preponderante en el metabolismo de los hidratos de carbono. En efecto, este órgano cumple la misión de entregar glucosa a la sangre en cantidad adecuada para mantener el nivel constante que se requiere para su apropiada utilización en los tejidos. La glucosa proviene de las reservas de glicógeno, el cual se encuentra en el hígado en una concentración que varía, en amplio margen, según los aportes hidrocarbonados que recibe el animal. Esta reserva aumenta cuando la glucosa sanguínea sube; en cambio, si el consumo de glucosa en los tejidos supera al suministro exógeno, el glicógeno hepático se despolimeriza entregando glucosa a la circulación y permitiendo así el mantenimiento de la glicemia en el nivel normal.

Pero la función del hígado no sólo consiste en esta interconversión de glucosa y glicógeno, sino que comprende también la formación de glucosa y de glicógeno, tanto a expensas de otros glúcidos (fructosa y galactosa), como de diversos productos de la degradación parcial de los hidratos de carbono (ácido láctico), de aminoácidos y de ácidos grasos. En los animales superiores, la transformación de materiales no glucídicos en glicógeno y en glucosa, es de vital importancia y se realiza casi exclusivamente en el hígado. En el estado de ayuno, ya sea total o sólo de hidratos de carbono, este proceso permite la utilización de las proteínas y de las grasas para mantener la glicemia en el nivel adecuado al funcionamiento de tejidos tan importantes como el nervioso y el muscular, cuya fuente energética fundamental, y tal vez única, es la glucosa.

2. 2. IMPORTANCIA DEL HÍGADO COMO FUENTE DE LA GLUCOSA SANGUÍNEA.

La función fundamental del hígado en el metabolismo de los hidratos de carbono fué ya conocida por Bernard (1853), quien descubrió el glicógeno y la posibilidad de su conversión en glucosa. Este autor reconoció el carácter esencialmente dinámico de la glicemia, considerándola como un estado de equilibrio muy delicado entre la utilización del azúcar por los tejidos y su producción en el hígado.

Numerosos investigadores, incluyendo algunos contemporáneos de Bernard, trataron de conocer el grado de importancia que tiene el hígado como fuente de la glucosa circulante, estudiando el efecto que la extirpación de este órgano produce sobre la glicemia. Los resultados obtenidos permitieron establecer que la hepatectomía o la evisceración abdominal total, ocasionaban, en aves (Minkowski, 1886; Kausch, 1897) y en mamíferos (Kaufmann, 1896; Macleod y Pearce, 1914; Patterson y Starling, 1913-14), un descenso progresivo de la glicemia, que conducía a la muerte del animal. El perfeccionamiento de las técnicas operatorias permitió progresar en el conocimiento del problema. Así se determinó, por ejemplo, que en perros hepatectomizados, la administración continua de glucosa en cantidades del orden de 0,25 g por kg de peso corporal y por hora, evitaba la muerte del animal por hipoglicemia (Mann, 1927). Estos experimentos dan una idea de la magnitud de la utilización periférica del azúcar y de su producción en el hígado. Una cifra parecida han encontrado otros investigadores en experimentos semejantes (Rosenthal, 1928; Yater, Markowitz y Cahoon, 1933). Por otra parte, esta magnitud concuerda con los resultados de experimentos en los que se midió directamente la utilización de la glucosa en los tejidos periféricos (Soskin y Levine, 1937; Soskin, Levine y Taubenhau, 1940).

El hecho de que durante la hipoglicemia intensa que sigue a la hepatectomía, se encuentren grandes cantidades de glicógeno en los músculos (Bollman, Mann y Magath, 1925), ha llevado al convencimiento de que el glicógeno muscular no es capaz de transformarse directamente en glucosa y que no desempeña, por lo tanto, ningún papel en la mantención de la glicemia en los animales hepatectomizados. Esta incapacidad del músculo para transformar su glicógeno en glucosa ha sido confirmada en investigaciones *in vitro*.

En efecto, en el diafragma de rata y en fibras musculares enteras de músculo abdominal de ratón, suspendidos en solución salina sin glucosa, se observa una disminución apreciable del glicógeno preexistente, sin que aparezca glucosa en el medio. En cambio, en situación semejante, los cortes de hígado liberan glucosa en cantidades que corresponden a una proporción importante del glicógeno desaparecido (§ 6. 3. 2).

Por otra parte, diversas condiciones experimentales, como la inyección de adrenalina, la anestesia etérea y la asfixia, producen hiperglicemia en el animal entero, pero no en el animal hepatectomizado (Soskin, 1927).

El riñón es también capaz de entregar glucosa a la circulación, pero en cantidad muy inferior a la necesaria para satisfacer los requerimientos del animal. En efecto, la presencia del riñón hace que la glicemia del animal hepatectomizado descienda más lentamente que en los casos en que a la extirpación del hígado se suma la nefrectomía bilateral (Russell, 1942; Reinecke, 1943; Roberts y Samuels, 1944). Los cortes de riñón entregan también glucosa al medio de incubación, aunque en proporción muy inferior a la observada en cortes de hígado (Teng, 1954).

2. 3. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SANGUÍNEA Y EL CONTENIDO DE GLICÓGENO HEPÁTICO.

La concentración de azúcar en la sangre circulante determina la cantidad de glucosa que el hígado entrega y la que fija en forma de glicógeno. La demostración directa de esta aseveración ha sido proporcionada por Soskin, Essex, Herrick y Mann (1938), quienes estudiaron la entrega de glucosa que el hígado hace a la sangre, midiendo el flujo sanguíneo a través del órgano y, al mismo tiempo, la diferencia en la concentración de glucosa de la sangre de entrada y de salida. En estas condiciones, cuando se eleva experimentalmente la concentración de glucosa en la sangre arterial, la entrega de glucosa se suprime y aumenta la formación de glicógeno; el descenso de la glicemia a su valor normal, por otra parte, restablece la entrega de glucosa por el hígado.

La velocidad de desaparición del glicógeno en cortes y en papilla de hígado, es también función del contenido de glucosa en el medio (Soskin, Levine y Taubenhau, 1939). En ciertas condiciones experimentales, al elevar la concentración de glucosa, no sólo se inhibe la glicogenólisis, sino que se logra producir síntesis neta de

glicógeno (Ostern, Herbert y Holmes, 1939; Buchanan, Hastings y Nesbett, 1949 a). Este problema será tratado con mayor detalle en el Capítulo 4.

Diversos factores hormonales modifican este proceso de entrega y captación de glucosa por el hígado, catalizando la reacción en uno y otro sentido. Este es sin duda un aspecto del mayor interés en el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono; sin embargo no nos referiremos a él, porque está fuera del propósito del presente trabajo.

2. 4. FORMACIÓN DE GLICÓGENO Y GLUCOSA A PARTIR DE OTRAS HEXOSAS.

La alimentación aporta, además de la glucosa, otros azúcares. Existen razones para pensar que la mayor parte de la fructosa y de la galactosa que ingresan al organismo son utilizadas después que el hígado las ha convertido en glicógeno o en glucosa. La incorporación de estas dos hexosas en el glicógeno hepático fué ya demostrada por Murschhauser (1911) en perros, y más tarde por Cori (1926) y por Cori y Cori (1928) en ratas, suministrando el azúcar correspondiente y midiendo posteriormente el contenido de glicógeno en el hígado. Harding, Grant y Glaister (1934) y Deuel, Mac Kay, Jewel, Gulick y Grunewald (1933) compararon, en ratas, la capacidad de tres hexosas (glucosa, fructosa y galactosa), para formar glicógeno, y concluyeron que en la interpretación de los resultados de experimentos de esta naturaleza, deben tenerse en consideración tanto la velocidad de su absorción intestinal y la velocidad de su utilización en los tejidos, como la duración del ayuno previo al suministro del azúcar.

En cortes de hígado, se ha demostrado la formación de glucosa (Cori y Shine, 1936; Goda, 1937, 1938; Renold, Hastings y Nesbett, 1954; Hill, Baker y Chaikoff, 1954) y de glicógeno (Chernick y Chaikoff, 1951; Renold, Hastings y Nesbett, 1954) a partir de fructosa (§ 6. 5). Con papillas y extractos de hígado, en cambio, Goda (1937, 1938) no pudo observar conversión de fructosa en glucosa. Sin embargo Cori, Ochoa, Slein y Cori (1951) lograron demostrar esta transformación, utilizando homogenizados de hígados enriquecidos con ATP y con sustratos oxidables.

La conversión de galactosa en un azúcar fermentable (glucosa) en cortes de hígado de rata, ha sido demostrada por Cori y Shine

(1936). La velocidad de esta conversión es alrededor de cinco veces menor que la de la fructosa.

El hígado no es absolutamente indispensable para el aprovechamiento de la fructosa, pues este azúcar se utiliza parcialmente en el perro hepatectomizado, en el cual logra aliviar los síntomas hipoglicémicos, elevando la glicemia y aumentando discretamente el glicógeno muscular. Este efecto es mucho menor que el de la glucosa (Mann y Magath, 1922; Bollman y Mann, 1931) y no se observa cuando la evisceración es completa, lo que se ha considerado como una indicación de que el intestino es capaz de convertir fructosa en glucosa (Bollman y Mann, 1931; Drury y Salter, 1934; Griffiths y Waters, 1936). Tal interpretación está de acuerdo con la observación hecha por Darlington y Quastel (1953) de que durante la absorción de fructosa por asas aisladas del intestino delgado, aproximadamente la mitad de ella se transforma en glucosa. Por otra parte, los estudios de Reinecke (1942 y 1944) destacan la importancia que tiene el riñón en la utilización de la fructosa, puesto que han demostrado la formación de glucosa a partir de fructosa en el riñón de rata eviscerada. Estos resultados concuerdan con lo referido por Goda (1938) y por Steward y Thompson (1941), quienes observaron que en cortes de riñón la fructosa desaparece del medio de incubación, al mismo tiempo que aparece glucosa.

Sin embargo, hay que destacar que la vía preferente de la utilización de la fructosa es su conversión en glucosa o glicógeno, en el hígado. En efecto, Cori (1926) en la rata, y Bollman y Mann (1931) en el hombre, han demostrado que la fructosa inyectada en una vena periférica desaparece de la sangre con una velocidad 10 veces menor que la glucosa; en cambio, si la inyección se coloca en la vena mesentérica, de modo que el azúcar pase por el hígado antes de llegar a los tejidos periféricos, su velocidad de utilización se duplica (Cori, 1926). Por otra parte se ha demostrado que la utilización directa de la fructosa es muy lenta en el músculo (Weichselbaum, Margraf y Elman, 1953).

2. 5. FORMACIÓN DE GLICÓGENO Y DE GLUCOSA A PARTIR DE METABOLITOS INTERMEDIOS.

Como veremos más adelante, en el proceso de la degradación de los hidratos de carbono se producen compuestos intermedios, antes de convertirse en anhídrido carbónico y agua. Habitualmente estos metabolitos intermedios se encuentran en las células y en la

sangre en muy pequeñas cantidades. En estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha podido demostrar que todos ellos (triosas, ácidos pirúvico y láctico y componentes del ciclo cítrico) son capaces de formar glucosa o glicógeno en el hígado (Shapiro, 1935; Cori y Shine, 1936; Buchanan, Hastings y Nesbitt, 1949 *b*; Topper y Hastings, 1949; y muchos otros). Experimentos en los que se han marcado con isótopos los posibles precursores, han venido a confirmar y a precisar algunos aspectos de esta transformación (ref. en Wood, 1951). El papel del hígado en estos procesos, si bien es primordial, no es exclusivo, pues también el riñón es capaz de formar glucosa a partir de piruvato, succinato y α -quetoglutarato, aunque en menor escala (Russell y Wilhelmi, 1941).

Entre los productos de la degradación de los hidratos de carbono, tiene una jerarquía especial el ácido láctico, pues se produce normalmente durante el metabolismo muscular y se encuentra en la sangre en una concentración vecina de 10 mg/100 ml de plasma. Durante el ejercicio muscular, la producción de ácido láctico se encuentra muy aumentada, lo cual confiere gran importancia a la capacidad que posee el hígado para transformarlo en glicógeno y en glucosa. Este proceso significa, al mismo tiempo, una defensa contra la acidosis y un mecanismo para proveer al músculo de glucosa, la que constituye su metabolito preferente (Gemmill, 1942). La capacidad del hígado para formar glicógeno a expensas del ácido láctico quedó ya demostrada en los experimentos de Röhmann (1886), quien administró por vía oral lactato de sodio o de amonio a conejos mantenidos varios días en ayunas, y encontró en el hígado una proporción de glicógeno superior a la de los testigos. A resultados similares llegaron Izume y Lewis (1926-27) administrando lactato de sodio por vía subcutánea a conejos en ayunas. Concuerdan estos datos, por otra parte, con los obtenidos por Mandel y Lusk (1906), quienes encontraron una sobreproducción de glucosa cuando se suministraba ácido láctico a perros intoxicados con floricina.

Trabajos posteriores de Cori y Cori (1929) y de Himwich, Koskoff y Nahum (1930), en ratas y perros respectivamente, precisaron mejor lo que se ha llamado el *ciclo del ácido láctico*. Estudiando simultáneamente los cambios que ocurren en el glicógeno muscular y hepático así como en la glicemia y en la lactacidemia, en condiciones experimentales diversas, que incluyen modificación de la actividad muscular, lograron establecer que el músculo degrada glicógeno y entrega a la circulación el ácido láctico resultante. En contra-

posición con el músculo de batracio, que es capaz de producir glicógeno a expensas del lactato (Meyerhof, 1920), el músculo de mamífero no realiza este proceso (ref. en Peters y van Slyke, 1946, pág. 120). El ácido láctico circulante es retirado por el hígado, que lo convierte en glicógeno y en glucosa, la cual vuelve a la circulación y llega al músculo, en donde puede ser aprovechada para formar glicógeno y para proporcionar energía.

También se ha demostrado que los cortes de hígado tienen la capacidad de formar glucosa y glicógeno a expensas del ácido láctico (Takane, 1926; Meyerhof y Lohmann, 1926).

2. 6. FORMACIÓN DE GLICÓGENO Y GLUCOSA A PARTIR DE PROTEÍNAS.

Si se supone que la única fuente de glucosa de que dispone un animal en ayunas en su reserva hidrocarbonada, se puede deducir fácilmente que en pocas horas ésta se agotaría, ocasionando una desaparición del azúcar sanguíneo (Soskin y Levine, 1950, pág. 12). Sin embargo, es un hecho conocido el que en animales sometidos a ayuno, aun muy prolongado, la glicemia se mantiene dentro de valores muy constantes. La explicación de este fenómeno reside en que el organismo es capaz de fabricar glucosa a expensas de otras sustancias no hidrocarbonadas, principalmente proteínas. Este proceso se conoce con el nombre de *gliconeogénesis*. Aunque se ha demostrado que el riñón es capaz de formar glicógeno y glucosa a expensas de diversos aminoácidos (Russell y Wilhelmi, 1941), el hígado es indudablemente el principal órgano que realiza este proceso.

En la diabetes, tanto humana como experimental, se produce una hiperglicemia acompañada de eliminación de cantidades importantes de glucosa por la orina, y simultáneamente se observa una excreción exagerada de sustancias nitrogenadas, urea en su mayor parte, que provienen de las proteínas utilizadas con fines energéticos. En gran parte, esta utilización se hace mediante su transformación previa en glucosa, lo que puede comprobarse experimentalmente suministrando a un animal pancreatectomizado una dieta exclusiva de proteínas o de aminoácidos y midiendo la glucosa eliminada por la orina. La sobreproducción de glucosa que se observa, debe corresponder a gliconeogénesis realizada a expensas de los compuestos nitrogenados de la dieta, pues se acompaña de una mayor excreción nitrogenada (Minkowski, 1893; Chaikoff, Macleod, Markowitz y Simpson, 1925; Macleod y Markowitz, 1926; Soskin, 1930). Un

fenómeno semejante se observa en la diabetes experimental producida por la intoxicación por floricina (Nash, 1927).

Constituye también un índice de la transformación de proteínas en hidratos de carbono, el aumento del glicógeno hepático que se observa en animales en ayuno después del suministro de una dieta proteica o de aminoácidos libres.

Para estudiar la gliconeogénesis que se realiza a expensas de proteínas se ha recurrido, además, a la perfusión del hígado con soluciones que contienen aquellos aminoácidos cuya capacidad glicogenética se desea investigar, así como a la incubación de cortes del órgano suspendidos en estas mismas soluciones. Así se han podido confirmar los datos obtenidos *in vivo*, aun cuando en muchos experimentos los resultados han sido contradictorios. Esta falta de uniformidad puede ser la consecuencia de diferencias en el comportamiento de las distintas especies. Así, por ejemplo, algunos aminoácidos, como la glicina, la isoleucina, la fenilalanina, la histidina, generan glicógeno en la rata y sin embargo parece que no lo producen en perros florinizados o normales (ref. en Soskin y Levine, 1950, pág. 162).

El conjunto de los resultados obtenidos en experimentos realizados con técnicas variadas, en diversas especies animales, ha conducido a aceptar que los siguientes aminoácidos pueden convertirse en hidratos de carbono: glicina, alanina, serina, valina, isoleucina, norleucina, ácido espártico, ácido glutámico, ornitina, arginina, cisteína, fenilalanina, tirosina, histidina, prolina, hidroxiprolina (ref. en Fruton y Simmonds, 1953).

En los últimos años se ha empleado la técnica de los isótopos para marcar las sustancias que son posibles precursoras del glicógeno y de la glucosa. Este procedimiento es indudablemente superior, en muchos aspectos, a los utilizados con anterioridad, pues ha permitido reconocer las etapas intermedias, que serán estudiadas más adelante (§ 3. 10. 3). Sin embargo, los experimentos con isótopos han creado algunos problemas nuevos. Así Olsen, Hemingway y Nier (1943) plantearon la duda respecto a la capacidad glicogenética de la glicina, por cuanto en ratas que recibían glicina marcada comprobaron un aumento del glicógeno hepático, pero éste no contenía carbonos isótopos; de esta manera no podía asegurarse que el glicógeno formado proviniera efectivamente de los átomos pertenecientes al aminoácido utilizado. Por otra parte, no es raro encontrar en el glicógeno o en la glucosa los carbonos marcados provenientes de

aminoácidos, cuya capacidad glicogenética no se revela con otras técnicas (ref. en Fruton y Simmonds, 1953, pág. 670). Es posible, pues, que aun cuando los carbonos correspondientes a un aminoácido desaparecido no vayan directamente a incrementar el glicógeno, sino a dar lugar a la producción de otras sustancias, tales como anhídrido carbónico o cuerpos quetónicos, sus carbonos marcados lleguen por vía indirecta al glicógeno. Frente a un fenómeno similar nos encontraremos más adelante, al analizar la conversión hipotética del ácido acético en glicógeno (§ 3. 10. 2).

2. 7. FORMACIÓN DE GLICÓGENO Y GLUCOSA A PARTIR DE LÍPIDOS.

Los ácidos grasos que se encuentran en el tejido adiposo, así como los que recibe el animal en la alimentación, están en su mayor parte esterificados con el glicerol, constituyendo las grasas neutras. Es necesario, pues, considerar separadamente la participación del glicerol y de los ácidos grasos en el proceso de la gliconeogénesis.

2. 7. 1. La formación de glicógeno y de glucosa a partir del glicerol, ha sido demostrada por numerosos investigadores. Así, Lüthje (1904) demostró la existencia de este proceso en perros pancreatectomizados; Cremer (1902), y más tarde empleando una técnica más depurada, Chambers y Deuel (1925), lo observaron en perros intoxicados con floricina; Shapiro (1935) pudo demostrarlo también en ratas normales sometidas a ayuno. La formación de hidratos de carbono fermentables a partir de glicerol y de glicero-fosfato ha sido observada también en cortes de hígado (Cori y Shine, 1936). El empleo del glicerol marcado con isótopos ha dado plena confirmación a estos hallazgos experimentales, tanto en el animal entero como en tejidos aislados (Swick y Nakao, 1954).

2. 7. 2. No es tan claro, sin embargo, el problema de la conversión de los ácidos grasos en hidratos de carbono, especialmente la de aquellos que poseen un número par de átomos de carbono, que son los más difundidos en la naturaleza. Según Soskin y Levine (1950, pág. 168), no puede explicarse satisfactoriamente la mantención de la glicemia en animales en ayunas ni la excreción de glucosa en la orina de animales pancreatoprivos, considerados únicamente los hidratos de carbono preexistentes y la gliconeogénesis proteica, lo que induce a pensar que los ácidos grasos contribuyen a formar glucosa. Sin embargo, los intentos experimentales para demostrar

esta transformación no han conducido a resultados uniformes. Muchos investigadores ponen en duda la posibilidad de la conversión de los ácidos grasos en glúcidos (ref. en Deuel y Morehouse, 1946).

El empleo de moléculas marcadas con isótopos ha venido a arrojar alguna luz sobre este discutido problema. En efecto, Buchanan, Hastings y Nesbett (1943) demostraron que cuando a ratas en ayuno se les suministran algunos ácidos grasos de cadena corta, como el acético y el butírico, marcados con C^{12} en el carboxilo, el glicógeno hepático que se forma contiene C^{12} . Experimentos posteriores, realizados con los mismos ácidos grasos (Lifson, Lorber, Sakami y Wood, 1948) y además con ácido octanoico (Lorber, Cook y Meyer, 1949), han confirmado estas observaciones. Usando sustratos marcados con C^{13} o C^{14} en diferentes posiciones, estos últimos autores han mostrado cuál podría ser el camino de la incorporación de los carbonos del ácido graso en el glicógeno, y cuál es la explicación de la discordancia entre estos experimentos y los obtenidos por las otras técnicas en las que se mide sólo la síntesis neta de hidratos de carbono. De este asunto nos preocuparemos más adelante (§ 3. 10. 2). También se ha demostrado la incorporación de los carbonos del ácido palmítico- C^{14} en la glucosa eliminada por la orina de perros pancreatoprivos (Abraham, Chaikoff y Hassid, 1952).

Los experimentos de Topper y Hastings (1949), realizados agregando acetato marcado en el carboxilo al medio donde se incuban cortes de hígado de conejo, concuerdan con los hallazgos precedentes.

2. 8. FORMACIÓN DE GRASAS A PARTIR DE HIDRATOS DE CARBONO.

Es un hecho ampliamente aceptado el que las grasas corporales pueden formarse no sólo a partir de los lípidos, sino también de los hidratos de carbono de la dieta. La observación antigua del engorde de los animales a base de alimentos ricos en glúcidos, constituye un argumento convincente. Las primeras demostraciones experimentales provinieron de estudios de balance, que señalaron la imposibilidad de explicar el destino de los hidratos de carbono suministrados, sumando el carbono que aparece en el aire espirado y en las excretas, con el que permanece en las reservas glucídicas. Esto obliga a considerar también el carbono depositado en el tejido adiposo (Meisl y Strohmer, 1883). El estudio del cociente respiratorio de los animales sometidos a una dieta rica en hidratos de carbono, ha proporcionado también argumentos indirectos de que ocurre la transformación de glúcidos en grasas, pues se han obtenido valores supe-

riores a la unidad, característicos de estas conversiones (Wieruchowski y Ling, 1925).

Los estudios realizados con átomos marcados han llevado a reconocer que uno de los destinos metabólicos más importantes de los hidratos de carbono es su conversión en grasas, para constituir depósitos que se encuentran en constante renovación. Mientras que la capacidad del organismo para almacenar glicógeno es limitada, su capacidad para depositar grasas es prácticamente ilimitada. Se ha podido demostrar que una parte de los glúcidos ingeridos en cada comida va inicialmente a incrementar los depósitos adiposos, y de allí las grasas son movilizadas para su combustión en los tejidos, ya sea directamente o previa degradación en el hígado hasta el estado de cuerpos cetónicos. En efecto, Stetten y Boxer (1944), utilizando deuterio, pudieron demostrar que, antes de ser quemada, la glucosa de la alimentación se convierte en mayor proporción en grasas que en glicógeno.

Se pensaba que el hígado es el principal sitio de producción de grasas a expensas de hidratos de carbono (ref. en Longenecker, 1941; y en Mc Henry y Cornett, 1944). Si bien había indicios en el sentido de que esta transformación pudiera realizarse en el tejido adiposo mismo (Tuerkischer y Wertheimer, 1942; Mirski, 1942; Shapiro y Wertheimer, 1948), sólo recientemente Favarger y Gerlach (1954) han demostrado en forma muy evidente que en el ratón la formación de grasas a partir de glucosa es más importante y más temprana en el tejido adiposo que en el hígado.

2. 9. INFLUENCIA DEL HÍGADO SOBRE LA UTILIZACIÓN DE GLUCOSA EN OTROS TEJIDOS.

Otra función del hígado, en relación con el metabolismo hidrocarbonado del resto del organismo, se deduce de los importantes experimentos de Lang, Goldstein y Levine (1954). Estos autores estudiaron el consumo de glucosa en la preparación de extremidades posteriores del perro, midiendo el flujo de sangre y la diferencia arteriovenosa de la glucosa sanguínea. Con este procedimiento pudieron demostrar que la utilización máxima de glucosa por estos tejidos periféricos es aproximadamente de 600 mg/kg/hora en los perros hepatectomizados, y de 1.500 mg/kg/hora en los perros intactos. Esta enorme diferencia en el consumo de azúcar es independiente de la acción de la insulina. El carácter humoral de la influencia del hígado sobre la utilización de glucosa por parte de los tejidos

periféricos, fué demostrado en algunos experimentos en los cuales se unieron por circulación cruzada un perro testigo con uno eviscerado. En estas condiciones, las extremidades posteriores de este último mostraron un consumo de glucosa enteramente similar al de un animal que no hubiera sufrido la hepatectomía.

Aunque estos experimentos son muy recientes y todavía no han recibido confirmación por medio de otros procedimientos, los consideramos de mucho interés, pues señalan la existencia de una función hepática desconocida hasta ahora, en relación con el metabolismo glucídico.

CAPÍTULO 3

METABOLISMO INTERMEDIO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

3. 1. En este capítulo se estudiarán, en forma resumida, las reacciones principales que constituyen el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, en lo que se refiere tanto a su degradación completa hasta anhídrido carbónico y agua, como a la formación de glicógeno y a la interconversión de glúcidos, lípidos y prótidos. Aunque gran parte de estas reacciones han sido descubiertas en investigaciones realizadas en el músculo y en levaduras, luego se ha comprobado que ellas tienen lugar también en otros tejidos y microorganismos. Como el propósito de este trabajo es el estudio del metabolismo hepático, en el análisis que haremos a continuación pondremos énfasis sólo en lo que concierne al hígado.

3. 2. FOSFORILACIÓN INICIAL DE LAS HEXOSAS.

La primera etapa en la utilización de las hexosas es su fosforilación, esto es, su conversión en un éster fosfórico (Fig. 1). Esta etapa no es siempre necesaria; en efecto, se ha descrito en el hígado un sistema enzimático, que tiene como coenzima un nucleótido piridínico, capaz de oxidar directamente la glucosa hasta ácido glucónico (Harrison, 1932; Strecker y Korkes, 1952). El fermento purificado ha sido obtenido del hígado de buey por Strecker y Korkes (1951). Los experimentos de Stetten y Topper (1953) en los que se suministra ácido glucónico marcado, muestran que su utilización es poco importante en el animal entero.

El fermento que cataliza la fosforilación de la glucosa, denominado hexoquinasa, fué descrito originariamente en la levadura y encontrado con posterioridad en casi todos los tejidos. El dador del

fósforo para la reacción es el adenosíntrifosfato (ATP). El fermento de la levadura es capaz de fosforilar tanto a la glucosa como a la fructosa; en cambio, en el hígado y en el músculo se han descrito enzimas diferentes para cada una de estas hexosas. La llamada *glucoquinasa* es capaz de convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato (G-6-P), mientras que la *fructoquinasa* convierte la fructosa en fructosa-1-fosfato (F-1-P) (Kjerulf-Jensen, 1942 *a* y *b*; Cori y Slein, 1947; Vestling, Irish, Hirsh y Grant, 1949; Vestling, Milroie, Irish y Grant, 1950; Slein, Cori y Cori, 1950; Leuthardt y Testa, 1950 y 1951; Staub y Vestling, 1951; Cori, Ochoa, Slein y Cori, 1951). Si bien la hexoquinasa de la levadura se ha obtenido en estado cristallino, la glucoquinasa y la fructoquinasa del hígado y del músculo sólo han podido ser aisladas en fracciones, más o menos impuras, de homogenizados de estos tejidos. La necesidad de trabajar con enzima impura tiene el inconveniente de que el producto de la reacción puede ser sustrato de otras acciones enzimáticas, lo que dificulta el conocimiento preciso de la cinética de la reacción. La medida de la actividad se basa en la determinación de la concentración inicial y final del sustrato (glucosa o fructosa), así como en la medida del éster fosfórico acumulado.

Con respecto a la vía de utilización de otras hexosas, como la galactosa y la manosa, es lo más probable que su primera etapa sea la conversión en galactosa-1-fosfato (Gal-1-P) y en manosa-6-fosfato (M-6-P), respectivamente, por medio de fermentos semejantes a los que han sido extraídos de diversos microorganismos (ref. en Leloir, 1951). La presencia de Gal-1-P ha sido demostrada por Kosterlitz y Ritchie (1943) en el hígado de ratas alimentadas con galactosa.

3. 3. FORMACIÓN Y DESTRUCCIÓN DEL GLICÓGENO.

La vía comúnmente aceptada para formar glicógeno a partir de glucosa y para degradarlo hasta hexosas, comprende diversas etapas que han sido estudiadas en diferentes tejidos animales (Fig. 1). Ellas corresponden esencialmente a las del proceso de síntesis de los polisacáridos en el reino vegetal, lo que aparece evidente en la revisión de la literatura realizada por Bernfeld (1951).

El G-6-P, primer producto fosforilado de la glucosa, es transformado en glucosa-1-fosfato (G-1-P) por la acción de la *fosfoglucomutasa*. Este fermento requiere como coenzima el glucosa-1-6-difosfato (G-di-P), que actúa en la forma esquematizada en la

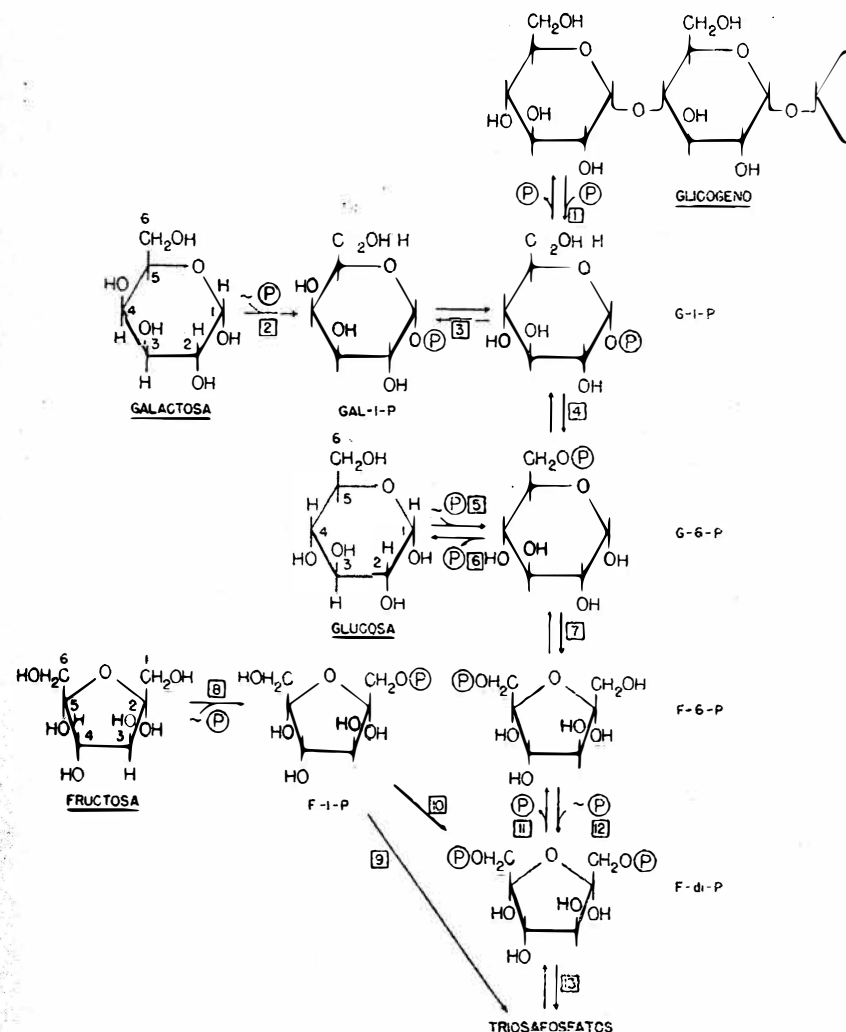


FIG. 1.—Primeras etapas de la utilización de las hexosas por la vía glicolítica. Las enzimas que catalizan las distintas reacciones (números encuadrados) son las siguientes: (1) fosforilasa; (2) galactoquinasa; (3) galactowaldenasa; (4) fosfoglucomutasa; (5) glucoquinasa; (6) glucosa-6-fosfatasa; (7) fosfohexoisomerasa; (8) fructoquinasa; (9) 1-fosfofructoaldosa; (10) 1-fosfofructoquinasa; (11) fructosa-di-fosfatasa; (12) 6-fosfofructoquinasa; (13) aldolasa.

Figura 2 (ref. en Leloir, 1951). La reacción es reversible, pero tiende a favorecer la conversión del G-1-P en G-6-P, pues en el momento del equilibrio existe un 6% de G-1-P y un 94% de G-6-P (ref. en Cori, 1942).

La formación de glicógeno consiste esencialmente en un alargamiento de sus cadenas terminales no reductoras, fenómeno que se produce debido a la incorporación de unidades de glucosa provenientes del G-1-P en un proceso de transglucosidación con liberación de fosfato inorgánico (Fig. 1). Esta reacción es catalizada por una enzima denominada *fosforilasa*, fermento que también actúa reversiblemente, produciendo la llamada fosforólisis del glicógeno. En este caso, se capta fosfato inorgánico del medio y se desprende una molécula de glucosa de los extremos no reductores del glicógeno, en forma de G-1-P. Para que la enzima actúe en el sentido de la síntesis del glicógeno, es condición indispensable la presencia de pequeñas cantidades de este polisacárido. El fermento requiere fos-

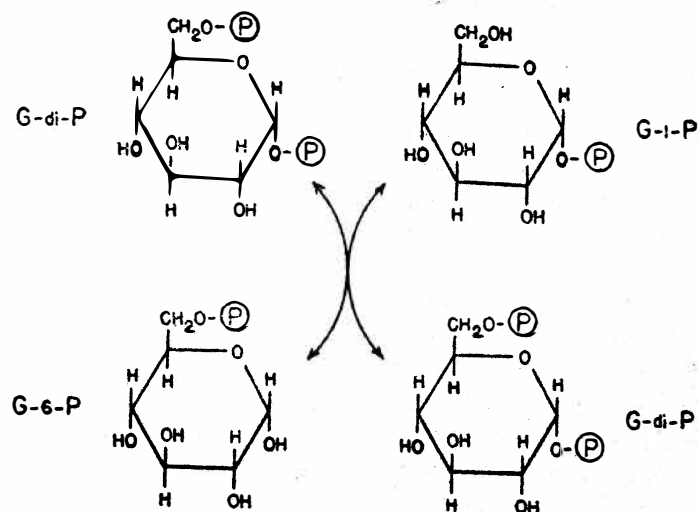


FIG. 2.—Participación del glucosadifosfato en la interconversión de G-1-P y G-6-P, catalizada por la fosfoglucomutasa.

fato inorgánico para actuar en el sentido de la degradación del glicógeno, como Cori, Cori y Schmidt (1939) demostraron, trabajando con extractos dializados de hígado de conejo. Este hecho se ha interpretado como una prueba de que la degradación del glicógeno es, en realidad, un proceso de fosforólisis y no de hidrólisis. La desaparición del glicógeno en los extractos de hígado va acompañada de una disminución del fosfato inorgánico del medio, que corresponde estequiométricamente a los hexosafosfatos formados. Estos

mismos extractos son capaces de sintetizar glicógeno a expensas de G-1-P cuando se purifican parcialmente para eliminar la fosfoglucomutasa y la glucosa-6-fosfatasa, y cuando el medio de incubación está exento de fosfato inorgánico. En estas condiciones se observa una correspondencia entre el fosfato inorgánico liberado y el glicógeno formado (Cori, Cori y Schmidt, 1939). Todas estas características de la fosforilasa pudieron ser confirmadas algunos años más tarde, cuando se obtuvo en estado cristalino la enzima del músculo (Green y Cori, 1943; Cori, Cori y Green, 1943). Se precisó, además, que la fosforilasa muscular existe en dos formas: una que es fácilmente cristallizable y que conserva gran parte de su actividad en ausencia de AMP, denominada fosforilasa *a*, y otra, amorfa, muy soluble, llamada fosforilasa *b*, que es completamente inactiva si no se añade AMP al medio de incubación. Se ha demostrado, asimismo, que la conversión de la primera forma en la segunda puede hacerse por intermedio de una enzima (enzima PR), que se encuentra tanto en el músculo como en otros tejidos. Recientemente se ha demostrado que la enzima PR no actúa, como se creyó en un tiempo, eliminando el ácido adenílico (Cori y Green, 1943), sino que escinde la molécula de fosforilasa *a* en dos moléculas proteicas (Keller y Cori, 1953). Del hígado también se han extraído una fosforilasa al estado puro y una enzima, también muy purificada, capaz de inactivarla (Sutherland, 1951 *a*; Sutherland y Wosilait, 1955). Se ha podido demostrar que a medida que la fosforilasa hepática es inactivada por el fermento correspondiente, se libera fosfato inorgánico. Esto ha hecho pensar que el mecanismo responsable de la activación y de la inactivación de la fosforilasa hepática en las células intactas esté relacionado con la captación y la entrega de fosfato (Sutherland y Wosilait, 1955).

La degradación del glicógeno hasta glucosa (*glicogenólisis*), que se realiza en el hígado y también en el riñón, requiere que el G-1-P producido por acción de la fosforilasa se transforme en G-6-P, bajo la influencia de la fosfoglucomutasa. El G-6-P es hidrolizado por la *glucosa-6-fosfatasa*, liberando glucosa y fosfato inorgánico. Esta fosfatasa es específica para el G-6-P, pues no ejerce sino una acción muy limitada sobre otros ésteres fosfóricos (Fantl y Rome, 1945; Duve, Berthet, Hers y Dupret, 1949; Swanson, 1950; Beaufay y Duve, 1954).

Es importante señalar el hecho de que este fermento no ha sido encontrado en el músculo (§ 7. 3.) lo que explicaría la incapacidad

de este tejido para transformar su glicógeno en glucosa, fenómeno que hemos comentado en páginas anteriores (§ 2. 2.).

La síntesis y la degradación del glicógeno no se realizan en forma exclusiva a través de la reacción catalizada por la fosforilasa. En efecto, esta enzima sólo es capaz de agregar o quitar glucosa en los extremos no reductores de las cadenas del glicógeno, en las cuales las unidades de glucosa están unidas por enlaces glucosídicos 1-4. Pero el glicógeno es una estructura ramificada, y estas ramificaciones resultan de la unión entre el carbono 1 de una molécula de glucosa de una cadena, con el carbono 6 de otra molécula ubicada en una cadena vecina. Para producir este enlace 1-6 se necesita de otro fermento, el llamado fermento o *factor ramificante*, que no es sino una transglucosidasa que permite la ruptura de una cadena lineal en un enlace 1-4, traspasando la porción distal al carbono 6 de una glucosa ubicada en una rama vecina (Larner, 1953) (Fig. 3).

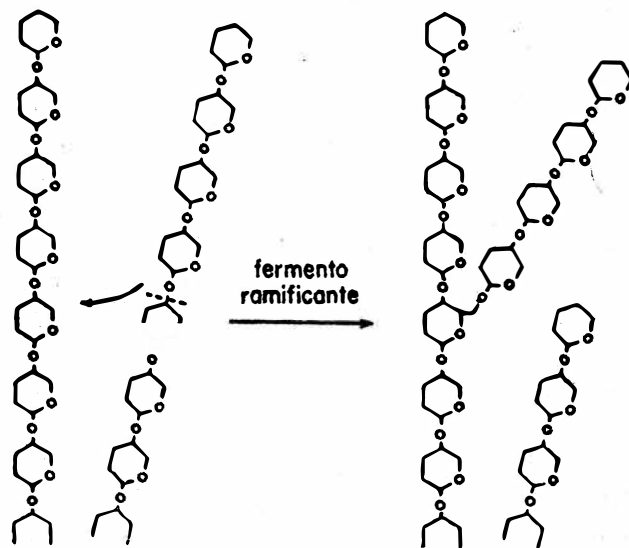


FIG. 3.—Representación esquemática de la acción del fermento ramificante.

Se sospechó la existencia de este fermento cuando al estudiar la síntesis de glicógeno a expensas de G-1-P, catalizada por la fosforilasa muscular, se obtuvo un polisacárido del tipo de la amilosa, es decir, de estructura lineal. En extractos de hígado, en cambio, el producto de la reacción era un polisacárido con las características

del glicógeno, y si se añadía una fracción de hígado a la preparación de músculo, se conseguía producir glicógeno (Cori y Cori, 1943). Lo que ocurría era que siendo la transglucosidasa del músculo muy lábil, se destruía rápidamente, y las preparaciones de hígado aportaban este factor ramificante. La fosforilasa hepática libre de fermentos ramificantes, obtenida por Sutherland (1951 *a*), forma amilosa a expensas de G-1-P, igual que la del músculo.

La ruptura de los enlaces 1-6, que ocurre durante la degradación del glicógeno, es catalizada por otro fermento, la *amilo-1-6-glucosidasa*, descubierto por Cori y Larner (1951). Su acción es hidrolítica y actúa en la unión glucosídica 1-6, siempre que el carbono 4 esté libre, o sea cuando, por acción de la fosforilasa, la cadena lateral ha quedado reducida a una sola molécula. En esta forma se explica la aparición de pequeñas cantidades de glucosa sin fosforilar, durante la degradación del glicógeno realizada por extractos libres de amilasa y de fosfatasa. Se ha descrito también una *isofosforilasa* (Meutémédian, 1954), obtenida de la papa, capaz de romper y crear enlaces 1-6, y que actúa de un modo semejante a la fosforilasa. Todavía no se sabe si en los tejidos animales existe un fermento semejante.

La acción combinada que estos diversos sistemas enzimáticos ejercen en la síntesis y en la degradación del glicógeno, permite explicar el hecho de que cuando se administra glucosa uniformemente marcada con C^{14} , el glicógeno hepático muestra una distribución de la radioactividad dentro de su molécula que varía según el tiempo que media entre la administración de la glucosa y el momento del examen. Así, mientras que en las primeras horas que siguen al suministro parenteral de una dosis única de esta glucosa la radioactividad se concentra en la periferia del glicógeno, después de 24 ó 48 horas, la actividad específica es superior en las porciones más internas de la molécula. En el glicógeno de los demás tejidos este proceso es más lento, lo que hace pensar que en ellos la actividad del fermento ramificante y la de la amilo-1, 6-glucosidasa son menores (Stetten y Stetten, 1955).

3. 4. CONVERSIÓN DE LA FRUCTOSA Y DE LA GALACTOSA EN GLUCOSA Y GLICÓGENO.

Hemos señalado en páginas anteriores que la fructosa y la galactosa pueden ser convertidas en glucosa o en glicógeno (§ 2. 4.). El mecanismo íntimo de estas conversiones no ha sido totalmente dilucidado; pero se dispone de datos que permiten formarse una

magen muy aproximada de lo que en realidad ocurre, especialmente si se asocian las observaciones obtenidas en el hígado, con las realizadas en algunos microorganismos.

3. 4. 1. La primera etapa en la utilización de la *fructosa* es su fosforilación por medio del ATP, para dar lugar al fructosa-1-fosfato (§ 3. 2.). Trabajando con homogenizados de hígado parcialmente purificados, Cori, Ochoa, Slein y Cori (1951) encontraron que el F-1-P puede transformarse en G-6-P, proceso que no ocurre en extractos de músculo de conejo o de cerebro de oveja. No se conocen con certeza las etapas intermedias de esta transformación. Se pensó en la posibilidad de que el F-1-P se convirtiera primero en F-6-P y luego, bajo la influencia de la fosfohexo-isomerasa, en G-6-P, o bien que se transformara directamente en G-1-P, bajo la acción de una isomerasa y luego en G-6-P. Sin embargo, Cori, Ochoa, Slein y Cori (1951) no lograron la reacción inversa, esto es, la conversión del F-6-P en F-1-P, ni la del G-1-P en F-1-P, siendo que teóricamente ambas reacciones debieran ser reversibles. Otra posibilidad es la de que en el hígado ocurra algo semejante a lo observado en el músculo, es decir, que el F-1-P se transforme en F-di-P siguiendo una reacción catalizada por una 1-fosfofructoquinasa en presencia de ATP (Slein, Cori y Cori, 1950) y que el F-di-P sea hidrolizado por la fosfatasa específica que existe en el hígado, formando F-6-P, el cual posteriormente es convertido en G-6-P. Estudios posteriores han demostrado que el F-1-P puede ser desdoblado directamente en aldehído glicérico y dihidroxiacetofosfato, bajo la acción de una aldolasa específica, la *1-fosfofructo-aldolasa*, que se ha encontrado en el hígado de rata (Hers y Kusaka, 1953; Leuthardt, Testa y Wolf, 1953; Leuthardt y Wolf, 1954). El aldehído resultante puede ser fosforilado en el carbono 3 por acción de una *trioquinasa* en presencia de ATP (Hers y Kusaka, 1953) y condensarse posteriormente con el dihidroxiacetofosfato, formando de esta manera el F-di-P. Administrando a la rata fructosa marcada con C^{14} en posición 1, se comprueba que aproximadamente la tercera parte de la radioactividad que aparece en el glicógeno hepático se encuentra en el carbono 6, fenómeno que se ha interpretado como la consecuencia de una fragmentación parcial de la fructosa en triosas, antes de ser incorporada en el glicógeno (Hers, 1955).

3. 4. 2. Con respecto a la *galactosa*, el hallazgo del Gal-1-P (Kosterlitz y Ritchie, 1943) hace pensar que éste sea el primer pro-

ducto de la fosforilación, idea que está de acuerdo con lo que Leloir y su grupo han encontrado en el *Saccharomyces fragilis* (ref. en Leloir, 1951). En este microorganismo se ha podido reconocer la vía de la conversión del Gal-1-P, gracias al descubrimiento de una nueva coenzima, el *uridíndifosfatoglucósido* (UDPG).

El UDPG reacciona con el Gal-1-P, dando lugar a la formación de *uridíndifosfatogalactósido* (UDPGal) y de G-1-P. A nivel de la coenzima se produciría la inversión de Walden por medio de una *galactowaldenasa*, regenerándose el UDPG (Leloir, 1951). Los experimentos de Topper y Stetten (1951) apoyan la idea de que *in vivo* se verifica la inversión directa en el carbono 4, pues en ratas que reciben galactosa marcada con C^{14} en el carbono 1, la mayor parte del C^{14} se encuentra posteriormente en el carbono 1 de la glucosa obtenida del glicógeno hepático. Una vez formado el G-1-P, es fácil imaginar las etapas siguientes hasta llegar a convertirse en glicógeno o en glucosa, como se explicó en el § 3. 3., y se resume en la Figura 1.

3. 5. VÍA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF PARA LA DEGRADACIÓN DEL GLUCOSA-6-FOSFATO.

3. 5. 1. *Etapa de los hexosafosfatos.*—De acuerdo con lo que hemos expuesto anteriormente, el G-6-P es un metabolito intermedio que puede provenir de la glucosa o del glicógeno. Este hexosafosfato puede seguir varios caminos: (i) ser desfosforilado, liberando glucosa (§ 3. 3.); (ii) ser convertido en F-6-P y continuar la vía metabólica llamada de Embden-Meyerhof, o (iii) ser oxidado hasta el estado de ácido 6-fosfogluconico y seguir luego la vía metabólica de Warburg-Dickens-Lipmann (§ 3. 6.).

En el esquema de Embden-Meyerhof (Fig. 1) el G-6-P es convertido en su isómero, el F-6-P, por medio de un fermento específico, la *fosfohexo-isomerasa*, encontrada por Lohmann (1933) en extractos de hígado y de otros tejidos y en microorganismos. Su presencia en homogenizados de hígado ha sido confirmada por Cori, Ochoa, Slein y Cori (1951), quienes observaron la transformación de F-6-P en glucosa y fosfato. La interconversión de hexosamonofosfatos es reversible.

El F-6-P adquiere luego un nuevo fosfato y forma el fructosa-1,6-difosfato (F-di-P), en reacción catalizada por una *fosfofructoquinasa* en presencia de ATP. Esta enzima no ha sido aún suficientemente estudiada, pero se ha conseguido extraerla de músculo de

conejo y purificarla parcialmente (Taylor, 1951). La reacción no es reversible; sin embargo, el F-di-P puede convertirse en F-6-P mediante la acción de una fosfatasa específica que se encuentra en el hígado (Lohmann, 1933; Gomori, 1943; Leuthardt, Testa y Wolf, 1953; Horecker, Gibbs, Klenow y Smyrniotis, 1954).

3. 5. 2. *Etapa de los triosafosfatos.*—Como puede apreciarse en la Figura 4, el F-di-P es desdoblado en dos triosafosfatos por una

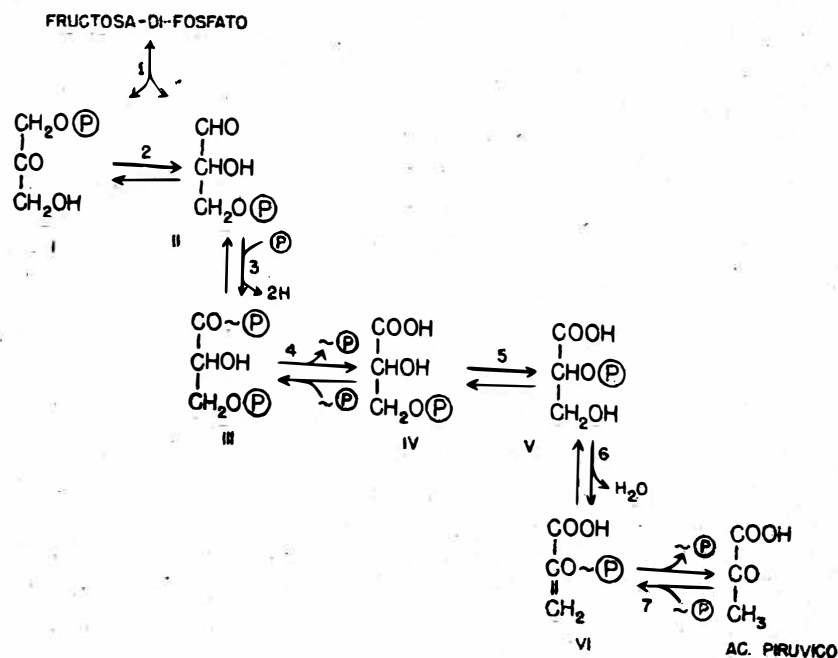


FIG. 4.—Etapa de los triosafosfatos en la degradación de las hexosas por la vía glicolítica. I, dihidroxiacetónfosfato; II, aldehído 3-fosfoglicérico; III, fosfoglicerilfosfato; IV, ácido 3-fosfoglicérico; V, ácido 2-fosfoglicérico; VI, ácido fosfoglicérico.—Las enzimas que catalizan las distintas reacciones son las siguientes: 1 aldolasa; 2, triosafosfato-isomerasa; 3, deshidrogenasa del aldehído 3-fosfoglicérico; 4, fosfoferasa específica; 5, fosfogliceromutasa; 6, enolasa; 7, fosfoferasa pirúvica.

aldolasa o *zimohehexasa*, en reacción fácilmente reversible. Los triosafosfatos resultantes son el aldehído D-3-fosfoglicérico y el dihidroxiacetónfosfato. El fermento que se encuentra en el músculo estriado ha sido purificado y cristalizado. En homogenizados de hígado se ha encontrado una actividad aldolásica muy inferior a la que pre-

senta el músculo en condiciones experimentales similares (Dounce y Beyer, 1948; Sibley y Lehninger, 1949; Dounce, Barnett y Beyer, 1950).

La actividad de la aldolasa no se limita a esta reacción, sino que abarca también la capacidad de condensar diversos aldehídos con el dihidroxiacetónfosfato (ref. en Lardy, 1949). Así, Lardy, Wiebelhaus y Mann (1950) han conseguido, mediante la condensación del aldehído L-glicérico con el dihidroxiacetónfosfato, la síntesis del L-sorbose-1-fosfato (S-1-P), sustancia que, como se verá más adelante, es un inhibidor específico de la hexoquinasa (§ 8. 3. 1.).

Los dos triosafosfatos ya mencionados son interconvertibles gracias a la acción de la *triosafosfato-isomerasa*, y a pesar de que el punto de equilibrio de la reacción aislada está muy desplazada hacia el dihidroxiacetónfosfato (96%), se acepta que en la célula la reacción ocurre en sentido contrario, debido a que el aldehído D-3-fosfoglicérico es retirado del medio por un proceso de oxidación.

Esta oxidación ha sido muy estudiada, debido a la importancia que tiene en la producción de un enlace fosfórico rico en energía, que resulta de la captación de fosfato inorgánico del medio para dar lugar al fosfoglicerilfosfato (1, 3-difosfoglicerato). Krimsky y Racker (1952) han descubierto que el fermento responsable, la *triosafosfatodeshidrogenasa*, posee como grupo prostético, indispensable para su actividad, el glutatión reducido. Este hecho explica la conocida sensibilidad que esta enzima ofrece a la acción de los agentes que bloquean los grupos -SH, como es el monoyodoacetato. De los trabajos de diversos grupos de investigadores, se deduce el papel importante que desempeñan los grupos -SH en el proceso de la oxidación, la cual se acompaña de la creación de un enlace rico en energía entre el azufre y el sustrato, enlace que por fosforólisis se convierte en la unión fosfórica rica en energía, propia del fosfoglicerilfosfato (Racker, 1954; Velick, 1954; Boyer y Segal, 1954). Veremos más adelante la participación que tienen los grupos -SH en la descarboxilación oxidativa de los quetoácidos que crea enlaces ricos en energía. Estos hechos muestran la existencia de cierta unidad de procedimientos en reacciones diferentes.

Por intermedio de una *transfosforilasa* específica, puede transferirse al ADP el fosfato unido al carbonilo del fosfoglicerilfosfato, formando así ATP y 3-fosfoglicerato, en reacción reversible.

Bajo la influencia de una *fosfogliceromutasa*, y actuando como cofermento el 2,3-difosfoglicerato, se produce la conversión del

3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato. El cofermento actúa de un modo semejante al glucosa-1,6-difosfato de Leloir, es decir, el 2,3-difosfoglicerato transfiere el fosfato del carbono 3 al carbono 2 del 3-fosfoglicerato, regenerándose así el cofermento y quedando libre el 2-fosfoglicerato (Fig. 5).

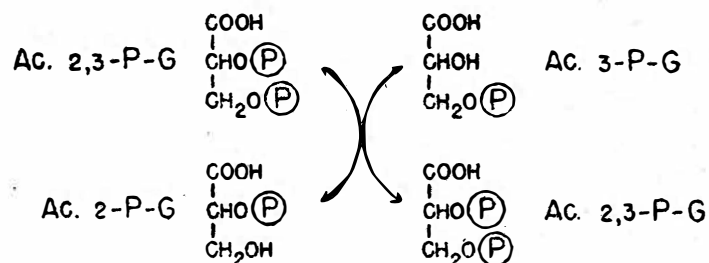


FIG. 5.—Participación del ácido 2,3-fosfoglicérico en la interconversión de los ácidos 3-P-G y 2-P-G.

El 2-fosfoglicerato se deshidrata bajo la acción de la *enolasa*, dando fosfoenolpiruvato, en el cual el radical fosfato aparece unido por medio de un enlace rico en energía.

Este fosfato puede ser transferido al ADP mediante una *transfosforilasa* específica, liberando piruvato. La reversibilidad de esta reacción ha sido demostrada por Lardy y Ziegler (1945).

3. 5. 3. *Destino del piruvato*.—El piruvato es una molécula muy reactiva, capaz de participar en diversas reacciones, en diferentes tejidos y microorganismos (Stotz, 1945; Guzmán-Barrón, 1952). Ellas pueden reducirse a cuatro fundamentales: (i) aminación, que lo convierte en alanina; (ii) descarboxilación que lo transforma en aldehído acético; (iii) reducción, que da lugar a la formación de ácido láctico, y (iv) oxidación, acompañada de descarboxilación, cuyo producto final es el «acetato activo». Nos preocuparemos especialmente sólo de las dos últimas.

La reducción del piruvato se efectúa por intermedio de la *deshidrogenasa láctica* y como cofermento actúa la coenzima I reducida (DPNH), aunque en algunas circunstancias lo hace también la coenzima II (TPNH). Se considera que esta reacción es la etapa final del proceso de la fermentación láctica (*glicólisis*) y se acepta que la coenzima reducida proviene fundamentalmente de la oxidación del triosafosfato. En anaerobiosis, el aceptor definitivo de estos hidró-

genos sería el piruvato; en cambio, en presencia de oxígeno, los hidrógenos pueden llegar a formar agua y dejar disponible el piruvato, para su descarboxilación oxidativa o para otras reacciones.

La intimidad de la reacción de descarboxilación oxidativa no ha sido aún totalmente dilucidada; pero se sabe que tal reacción se cataliza por un sistema enzimático, la *deshidrogenasa pirúvica*, que actúa en conexión con cuatro cofermentos: el nucleótido difosfopiridínico, la difosfotiamina, el ácido tióctico y la coenzima A. En la Figura 6 se indica el mecanismo probable de la descarboxilación

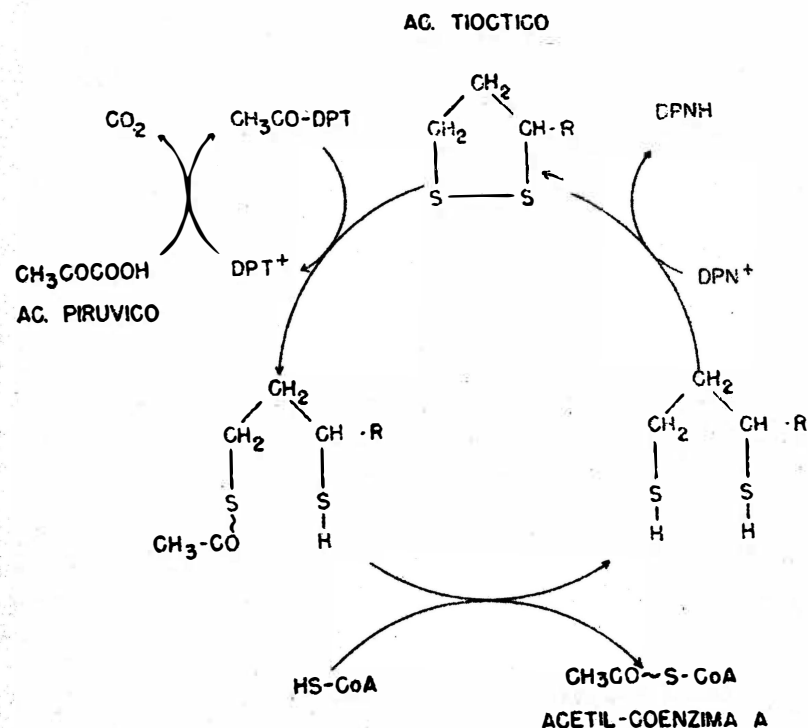


FIG. 6.—Representación esquemática de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico.

$\text{R} = -(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$; DPT^+ = difosfotiamina; DPN^+ = nucleótido difosfopiridínico; HS-CoA = Coenzima A.

oxidativa del ácido pirúvico (Gunsalus, 1954). Puede apreciarse en ella, la participación que cabe a los grupos $-\text{SH}$ del ácido tióctico, que permiten la creación de un enlace rico en energía entre el radical acetilo y el azufre. El radical acetilo sería transferido a la coen-

zima A, constituyendo la acetilcoenzima A, que mantiene el enlace rico en energía y constituye, por esto, el compuesto llamado «acetato activo». Este último cuerpo tiene la característica de participar en numerosas reacciones, en las cuales el acetilo se acopla a otras moléculas, en reacciones de gran interés biológico (ref. en Lipmann, 1954). La fosforólisis de la acetil-coenzima A puede dar lugar a la formación de acetato libre y de fosforilcoenzima A, la cual posee un enlace fosfórico rico en energía y es capaz, por eso, de fosforilar al ADP y convertirlo en ATP.

Una de las reacciones más importantes en las que participa la acetilcoenzima A, es la formación de ácido cítrico, resultante de la unión del acetilo con el ácido oxalacético. Esta reacción constituye la etapa inicial del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, descrito por Krebs, ciclo que termina en la oxidación completa del acetilo. (§ 3. 8. 1).

3. 6. VÍA OXIDATIVA DE WARBURG-DICKENS-LIPMANN PARA LA DEGRADACIÓN DEL GLUCOSA-6-FOSFATO.

3. 6. 1. La vía oxidativa, estudiada hace algunos años por Warburg (Warburg, Christian y Griesse, 1935; Warburg y Christian, 1937), Lipmann (1936) y Dickens (1938 *a* y *b*), es una alternativa de la llamada vía glicolítica de degradación de los hidratos de carbono que ha adquirido últimamente gran importancia. Se ha podido comprobar su amplia difusión tanto en el reino animal como en el vegetal, y ha permitido explicar los procesos de formación de numerosas sustancias naturales cuyo origen era, hasta hace poco tiempo, totalmente desconocido. La denominación de vía oxidativa pone énfasis en el hecho de que las primeras etapas de la degradación son oxidaciones, en contraposición con la vía glicolítica, en la cual la oxidación se produce sólo después de la división anaeróbica en triosas (Fig. 7).

3. 6. 2. *Etapas oxidativas.*—En la primera etapa de la oxidación, el G-6-P es transformado en 6-fosfogluconato por acción de una deshidrogenasa específica que tiene como cofermento el TPN. Esta deshidrogenasa corresponde al denominado *Zwischenferment*, extraído por Warburg de glóbulos rojos. Se ha demostrado que en esta reacción se forma una lactona como producto intermedio de la deshidrogenación (Cori y Lipmann, 1952), lactona que por hidrólisis catalizada por otra enzima formaría el 6-P-gluconato (Bro-

diey Lipmann, 1955). La deshidrogenasa del G-6-P se encuentra en el hígado de diversas especies animales y en muchas otras clases de células, con la posible excepción del músculo esquelético y el cerebro (Dickens y Gloek, 1951; Scott y Cohen, 1951).

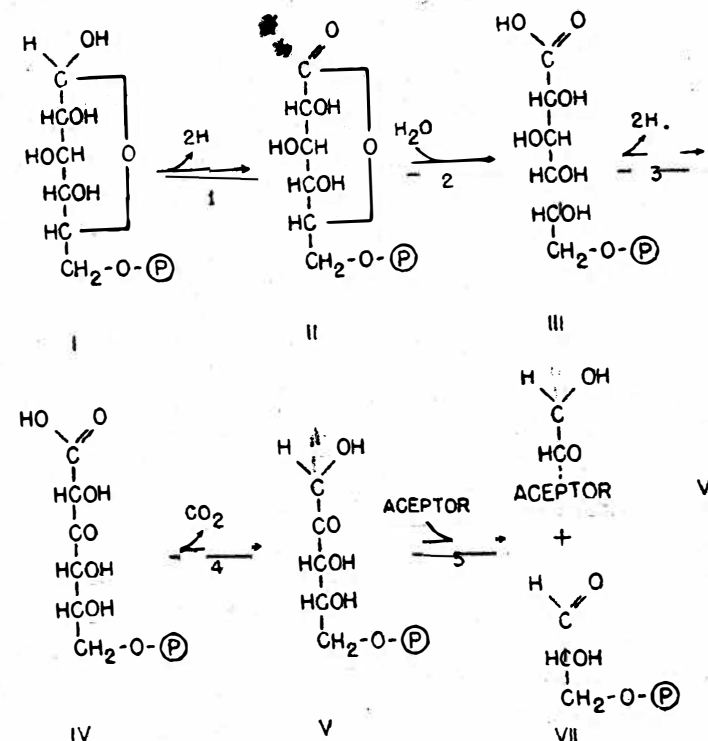
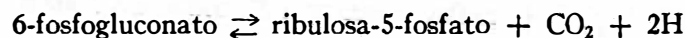


FIG. 7.—Degradación del glucosa-6-fosfato por la vía oxidativa. I, G-6-P; II, lactona del ácido 6-P-gluconico; III, ácido 6-P-gluconico; IV, intermedio hipotético; V, ribulosa-5-P; VI, aldehído glicólico activo; VII, aldehído 3-fosfoglicérico. Las enzimas que catalizan las distintas reacciones son las siguientes: 1, deshidrogenasa del G-6-P; 2, gluconolactonasa; 3, deshidrogenasa del ácido 6-P-gluconico; 4, carboxilasa; 5, transketolasa.

El G-P-gluconato sufre una nueva oxidación, y es transformado en ribulosa-5-fosfato con liberación de una pareja de hidrógenos y de una molécula de anhídrido carbónico. La reacción es catalizada por la *deshidrogenasa 6-fosfogluconica*, cuyo cofermento es también el TPN. Esta enzima se encuentra en diversos tejidos animales y

ha sido extraída del hígado de conejo (Seegmiller y Horecker 1952; Horecker y Smyrniotis, 1951); en el músculo esquelético su actividad es muy escasa (Horecker y Smyrniotis, 1951). No se sabe aún con certidumbre si el proceso de descarboxilación oxidativa se realiza en un solo tiempo, o si se produce en primer lugar la deshidrogenación, formando un cuerpo intermedio, el 3-quetó-6-fosfogluconato, que sufre una descarboxilación posterior (Horecker y Smyrniotis, 1951; Ochoa y Stern, 1952). La reacción



es fácilmente reversible, lo que constituye un apoyo para la primera interpretación (Ochoa y Stern, 1952).

Cuando se estudia esta reacción en preparaciones de hígado o de otros tejidos, en las cuales la enzima está sólo parcialmente purificada, se obtiene una mezcla de ribulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato. Este hecho se explica por la presencia de un fermento que cataliza la interconversión de ambos pentosafosfatos, el que ha sido denominado *pentosafosfato-isomerasa* (Horecker, Smyrniotis y Seegmiller, 1951; Horecker y Smyrniotis, 1952). La relación de equilibrio sería aproximadamente de una molécula de quetosa por tres de aldosa (Seegmiller y Horecker, 1952). Usando sustrato marcado, Horecker, Smyrniotis y Seegmiller (1951) han demostrado, en preparaciones de levadura, que el producto primario es realmente el ribulosa-5-fosfato.

3. 6. 3. Etapa anaeróbica.—El ribulosa-5-fosfato es el sustrato de una *transquetolasa*, que ha sido purificada del hígado, y que requiere como cofermento el pirofosfato de tiamina (Horecker, Smyrniotis y Klenow, 1953). Esta transquetolasa escinde el ribulosa-5-fosfato en una molécula de triosa, el aldehído 3-fosfoglicérico, y en un fragmento de dos átomos de carbono. Este último parece ser un aldehído glicólico «activo», pues es fácilmente incorporado a otras moléculas de monosacáridos dando lugar a un alargamiento de la cadena. En realidad, la escisión sólo tiene lugar cuando existen aceptores de este aldehído, pues nunca se ha conseguido obtener el aldehído glicólico libre (Horecker, Smyrniotis y Klenow, 1953; Racker, Haba y Leder, 1953). El triosafosfato podría seguir las reacciones conocidas que lo transforman en piruvato, uniéndose de

esta manera en un conjunto metabólico común con los triosafosfatos producidos por vía glicolítica (Figura 4).

3. 6. 4. Destino del aldehído glicólico.—El destino del aldehído glicólico «activo» es muy interesante, pues bajo la influencia de la transquetolasa puede participar en múltiples reacciones, como se indica en la Figura 8, adaptada de Horecker (1954). Con respecto

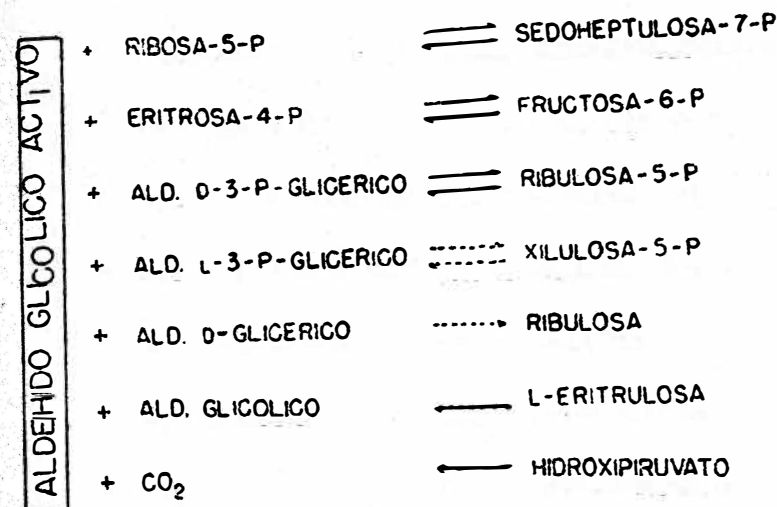


FIG. 8.—Destinos del aldehído glicólico «activo». Las flechas interrumpidas corresponden a reacciones hipotéticas.

al metabolismo glucídico en el tejido hepático, conviene destacar la formación de heptosas y hexosas a partir de pentosas. Trabajando con extractos purificados de hígado, se ha visto que los pentosafosfatos pueden formar sedoheptulosa-7-fosfato (Horecker y Smyrniotis, 1952) y fructosa-6-fosfato (Horecker y Smyrniotis, 1953; Horecker, Gibbs, Klenow y Smyrniotis, 1954). Se considera que la formación de la heptulosa es el resultado de una transferencia del aldehído glicólico «activo» desde el ribulosa-5-fosfato al ribosa-5-fosfato, proceso en el cual se libera aldehído 3-fosfoglicérico (Fig. 9).

El mecanismo de la síntesis del hexosafosfato ha sido estudiado especialmente por Horecker, Gibbs, Klenow y Smyrniotis (1954) quienes, utilizando pentosafosfato marcado isotópicamente en diversos carbonos, han llegado a la conclusión de que en los extractos empurificados de hígado operan, al menos, tres mecanismos que permiten explicar los resultados observados (Fig. 9):

(i) Por la acción de la transketolasa se transferiría al aldehído glicólico «activo» desde una molécula de ribulosa-5-fosfato a una de ribosa-5-fosfato (R-5-P), formándose sedoheptulosa-7-fosfato (S-7-P) y aldehído 3-P-glicérico. El S-7-P, por la acción catalítica de la *transaldolasa* (Horecker y Smyrniotis, 1953) cedería un radical dihidroxiacetona «activo» al aldehído 3-P-glicérico, obteniéndose de esta manera F-6-P y un tetrosa-4-fosfato. Estudios posteriores han demostrado que éste es el D-eritrosa-4-fosfato (E-4-P) (Horecker, Smyrniotis, Hiatt y Marks, 1955);

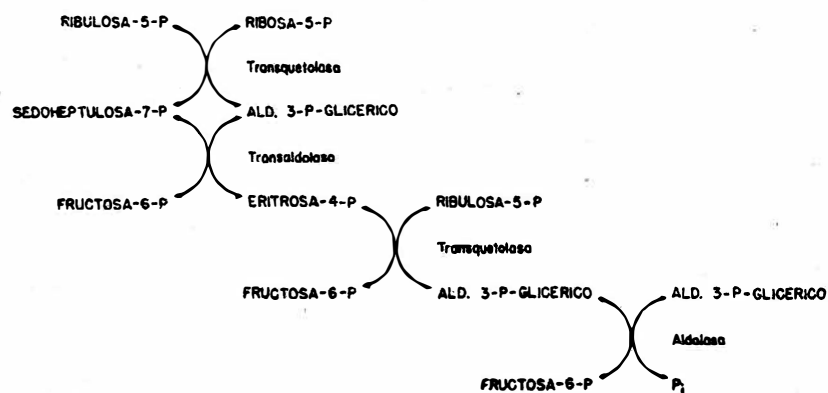


FIG. 9.—Vías de formación del fructosafosfato a expensas de pentosa-fosfatos.

(ii) El ribulosa-5-P podría transferir un aldehído glicólico «activo» al E-4-P, en una reacción catalizada por la transketolasa, formando F-6-P y aldehído 3-P-glicérico;

(iii) Dos triosafosfatos podrían reaccionar entre sí bajo la influencia de la aldolasa, originando F-di-P, el que por desfosforilación se convertiría en F-6-P.

La síntesis de fructosa-6-fosfato es muy importante, pues establece un nuevo puente de unión entre la vía oxidativa y la vía glicolítica, y explica, entre otras cosas, la formación de glicógeno a partir de pentosas. El conjunto de reacciones que conducen a la regeneración de hexosafosfatos representa un ciclo metabólico que permite la oxidación paulatina de los hidratos de carbono sin llegar al ciclo de Krebs. Su conocimiento es fundamental para estudiar tanto las reacciones mutuas entre diversos metabolitos así como las

acciones farmacológicas que bloquean parcialmente determinadas etapas del ciclo cítrico.

Fuera de la importancia que tiene la vía oxidativa en las reacciones de síntesis y de degradación de los monosacáridos en el hígado, es necesario destacar otros aspectos que son del más alto interés. Uno de ellos es la formación de las pentosas que se incorporan en los nucleótidos, asunto que ha sido recientemente revisado por Plaza de los Reyes (1955). Otro es su participación en el proceso de la fotosíntesis, pues las mismas reacciones que suceden en extractos de hígado han sido encontradas en tejidos vegetales (ref. en Racker, 1954). Los ésteres fosfóricos de la ribulosa y de la sedoheptulosa están adquiriendo una importancia cada vez mayor, en cuanto se sabe que no sólo intervienen en la formación de hexosas precursoras inmediatas de los polisacáridos, sino también en el proceso mismo de la fijación del anhídrido carbónico (Calvin, 1954; Horecker, 1954).

3. 7. IMPORTANCIA RELATIVA DE LAS VÍAS GLICOLÍTICA Y OXIDATIVA.

Conocida la existencia de dos vías paralelas en las primeras etapas de degradación de la glucosa, ha interesado conocer cuál es la importancia relativa de cada una de ellas en los diferentes tejidos. Con el objeto de resolver este problema, se han incubado cortes de diversos tejidos en presencia de glucosa marcada en diferentes posiciones y se ha medido la velocidad de producción del $C^{14}O_2$ y del lactato marcado, precisándose en este último la ubicación del isótopo. También se ha recurrido al procedimiento de comparar en los diversos tejidos el destino de los carbonos isótopos provenientes de glucosa, ácido láctico y gluconato marcados en diversas posiciones. Los resultados obtenidos por distintos grupos de investigadores no han sido uniformes. Así, Stetten y colaboradores, empleando procedimientos que abordan el problema desde diversos ángulos, han llegado a la conclusión de que en cortes de hígado de rata aproximadamente la mitad de la glucosa que se oxida lo hace por la vía oxidativa; en cambio, el diafragma del mismo animal utiliza únicamente la vía glicolítica y el riñón ocupa una posición intermedia (Bloom, Stetten y Stetten, 1953; Bloom y Stetten, 1953; Bloom y Stetten, 1955). Por otra parte, Katz, Abraham, Hill y Chaikoff (1954 y 1955), han concluido que los cortes de hígado de rata utilizan la vía oxidativa en una proporción pequeña, y Landau, Hastings y Nesbitt (1955) dan cuenta de experimentos que demostrarían que en sus condiciones de trabajo el hígado de rata utilizaría la vía oxida-

tiva también en una mínima proporción (10%). En hígado de ratón, los resultados de Abraham, Hill y Chaikoff (1955) indican que opera casi exclusivamente la vía glicolítica.

El estudio en tumores parece indicar que existe en ellos una participación importante de la vía oxidativa (Abraham, Hill y Chaikoff, 1955).

3. 8. CICLO CÍTRICO DE KREBS.

3. 8. 1. El ciclo cítrico de Krebs está constituido por una serie de reacciones encadenadas, en las cuales el acetilo se convierte en anhídrido carbónico y agua, liberando energía utilizable por el organismo. Este ciclo fué descubierto en papillas de músculo de paloma; posteriormente ha sido encontrado también en el hígado y en una variedad de tejidos animales y vegetales, así como en numerosos microorganismos. El reconocimiento de la existencia de este ciclo se ha hecho estudiando la desaparición de ciertos sustratos, así como la acumulación de algunas sustancias bajo la influencia de inhibidores más o menos específicos de ciertas reacciones. La utilización de sustratos marcados isotópicamente ha contribuido en buena medida al conocimiento más exacto de todo el proceso. En la actualidad se conoce en detalle el mecanismo de cada una de las reacciones, y se han aislado en forma soluble y purificada la mayoría de los fermentos responsables, cuyas condiciones cinéticas, coenzimas y factores accesorios (iones) han sido estudiados. Ha facilitado mucho el estudio de este conjunto de reacciones, el hecho de que todas ellas se realizan en las mitocondrias, las cuales pueden ser separadas fácilmente de los demás componentes celulares.

En la Figura 10 aparece un esquema del ciclo cítrico de Krebs. No parece necesario referirse a él sino someramente, pues hay magníficas revisiones del asunto a las cuales puede acudir quien tenga interés en conocerlo más profundamente (Krebs, 1943; Green, 1949; Martius y Lynen, 1950).

La acetil-CoA, formada en la descarboxilación oxidativa del piruvato o en el curso de la oxidación en β de los ácidos grasos, es capaz de reaccionar con el oxalacetato bajo la acción catalítica de un *fermento condensante*, produciendo citrato y dejando libre la coenzima A. El citrato es transformado en isocitrato, a través de un proceso de isomerización que se realiza teniendo como sustancia intermedia al *cis*-aconitato. En este proceso de isomerización, que es catalizado por la *aconitasa*, aparece un grupo alcoholílico secunda-

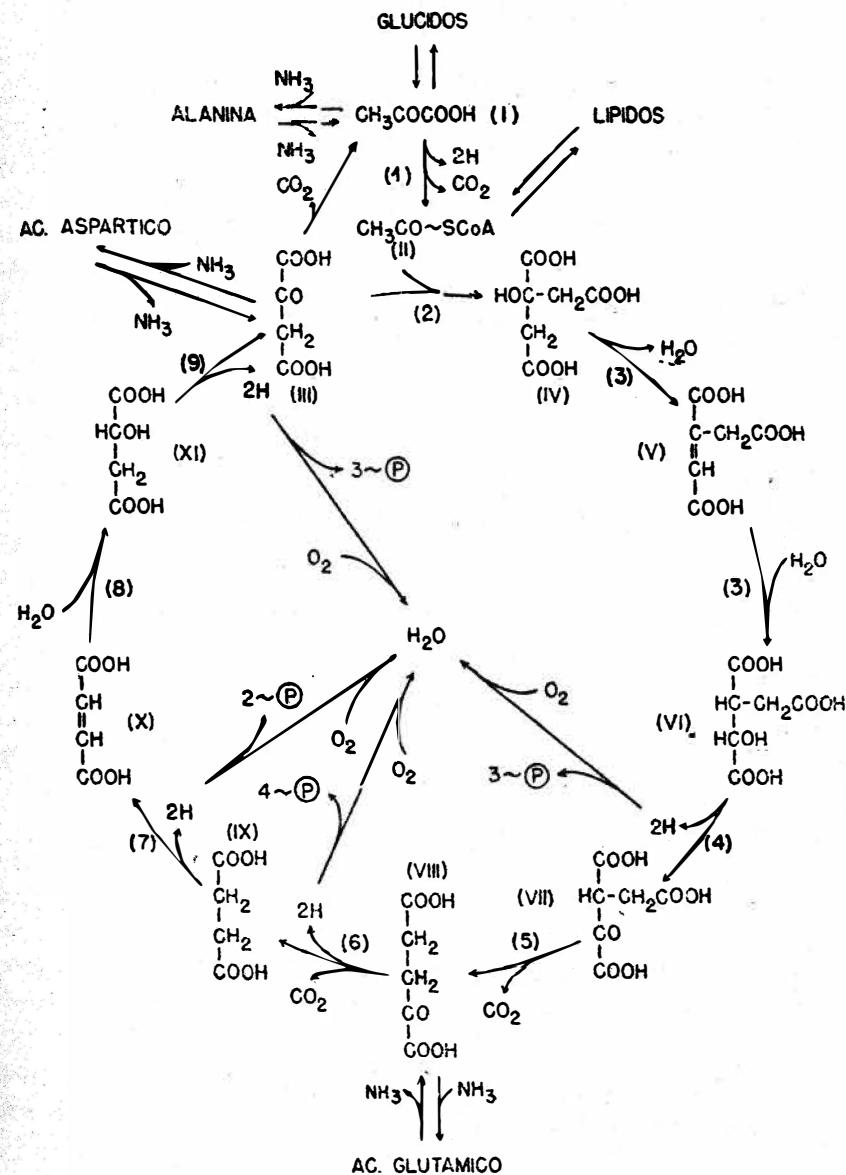


FIG. 10.—Ciclo cítrico de Krebs. I, ácido pirúvico; II, acetilcoenzima A; III, ácido oxalacético; IV, ácido cítrico; V, ácido *cis*-aconítico; VI, ácido isocítrico; VII, ácido oxalosuccínico; VIII, ácido α -quetoglutarico; IX, ácido succínico; X, ácido fumarico; XI, ácido málico. Las enzimas que catalizan las distintas reacciones son las siguientes: 1, deshidrogenasa pirúvica; 2, enzima condensante; 3, aconitasa; 4, deshidrogenasa isocítrica; 5, carboxilasa oxalosuccínica; 6, deshidrogenasa α -quetoglutarica; 7, deshidrogenasa succínica; 8, fumarasa; 9, deshidrogenasa málica. En el centro se ha indicado el número de enlaces fosfóricos ricos en energía producidos durante la oxidación de los hidrógenos que se liberan en las reacciones respectivas.

rio en posición β con respecto a un carboxilo. Esto hace posible la descarboxilación oxidativa del isocitrato, bajo la influencia del llamado *fermento isocítrico*, que es activado por Mg^{++} y que requiere coenzima II. En la descarboxilación oxidativa se produce la salida simultánea de dos hidrógenos y de una molécula de anhídrido carbónico; pero en ciertas condiciones ha sido posible separar la etapa oxidativa propiamente tal, obteniéndose el oxalosuccinato, el cual posteriormente sufre la descarboxilación (Fig. 10). Ya sea que se trate de una reacción única o de dos reacciones consecutivas, el cuerpo resultante es el α -quetoglutarato, el cual sufre una nueva descarboxilación oxidativa y da lugar a la formación de succinato; el fermento responsable de esta reacción es una *deshidrogenasa* (u oxidasa), cuyo mecanismo íntimo de acción es semejante al de la enzima responsable de la descarboxilación oxidativa del piruvato; requiere también coenzima I, difosfotiamina, ácido tióctico y coenzima A. De esta reacción resulta como compuesto intermedio la succinil-CoA, substancia que puede ser utilizada en algunas síntesis biológicas, como por ejemplo, la de porfirinas. El succinato libre es deshidrogenado por la *deshidrogenasa succínica*, cuyo cofermento sería el citocromo *b*. El cuerpo resultante es el fumarato, el cual, por acción de la *fumarasa*, se hidrata, transformándose en ácido málico, el que a su vez se *deshidrogena* (Co I), y produce el oxalacetato, con lo cual el ciclo se cierra.

Es importante señalar que el ciclo puede abrirse, pues el malato y el oxalacetato en ciertas condiciones dan lugar a la formación de piruvato, reacción que podría constituir el camino hacia la síntesis de glicógeno o de glucosa a partir de cualquiera de los componentes del ciclo de Krebs. En el caso del oxalacetato, que es un β quetoácido, la descarboxilación puede realizarse espontáneamente; sin embargo, es favorecida por la presencia de Mg^{++} , así como también por un fermento específico que requiere este ión (ref. en Ochoa, 1951). El oxalacetato puede descarboxilarse también bajo la acción catalítica de otra enzima que ha sido encontrada en el hígado de pollo por Utter y colaboradores (Utter y Kurahashi, 1954 *a* y *b*; Utter, Kurahashi y Rose, 1954). Esta reacción que es perfectamente reversible, requiere ATP o inosíntrifosfato (ITP) y el producto de la descarboxilación es el fosfoenolpiruvato. El malato produce directamente piruvato, mediante una descarboxilación oxidativa catalizada por el *fermento málico* en presencia de Co II, sin que sea necesaria la formación intermedia de oxalacetato (ref.

en Ochoa, 1951). Esta reacción es semejante a la que experimentan el isocitrato y posiblemente el 6-fosfogluconato (§ 3. 6. 2).

Durante el desarrollo del ciclo cítrico, la molécula de acetilo que se incorporó al oxalacetato desaparece totalmente, transformándose en anhídrido carbónico y agua. Sin embargo, no bastan los átomos de oxígeno y de hidrógeno del acetilo para explicar las dos moléculas de anhídrido carbónico y las cuatro parejas de hidrógenos que se liberan en el ciclo. Los átomos que faltan son suministrados por el agua incorporada en algunas de las reacciones. Estas moléculas de agua permiten la liberación de hidrógenos del sustrato hidratado, con producción de la energía correspondiente. Así por ejemplo, la hidratación del fumarato, que lo convierte en malato, es una reacción fácilmente reversible que no necesita, por lo tanto, energía libre; pero el malato formado entrega una cantidad importante de energía libre cuando se deshidrogena y se convierte en oxalacetato.

3. 8. 2. Fosforilación oxidativa.—La energía liberada en el curso de las oxidaciones —tanto en las que ocurren en el ciclo de Krebs como en otras— resulta aprovechable para la célula en cuanto es utilizada en la formación de enlaces fosfóricos ricos en energía. Estos últimos, a través del sistema de los adenosínpolifosfatos, permiten a las células realizar muy variadas reacciones endergónicas. El proceso de la formación de enlaces ricos en energía a expensas de las óxido-reducciones, constituye un problema de gran interés que ha sido muy investigado en estos últimos años. Sin embargo, la intimidad del proceso está todavía en la oscuridad, aunque no faltan imágenes que pretenden aclararlo (Kaplan, 1951).

La observación fundamental consiste en que simultáneamente con el consumo de oxígeno se produce desaparición de fosfato inorgánico del medio donde respiran papillas de tejidos o mitocondrias aisladas. En preparaciones frescas de mitocondrias, lavadas repetidas veces hasta eliminar el fosfato inorgánico, se observa que, dentro de ciertos límites, el consumo de oxígeno es función lineal de la concentración de fosfato inorgánico que se agrega al medio de suspensión, y que en ausencia de fosfato este consumo desaparece casi por completo. Para que haya respiración se requiere, además, la presencia de cierta concentración de Mg^{++} y de cantidades catalíticas de algún adenosínfosfato. Los estudios realizados con fosfato inorgánico P^{32} , han demostrado que mientras las mitocondrias es-

tán respirando este fosfato se incorpora a los adenosínfosfatos con un enlace rico en energía. Si se añade al medio un sistema aceptor del fosfato terminal del ATP, como por ejemplo glucosa más hexoquinasa o creatina más creatínfosfoquinasa, se observa que el fosfato inorgánico desaparece del medio y se incorpora a la glucosa o a la creatina, respectivamente. Este conjunto de hechos hace pensar que la respiración es un fenómeno ligado necesariamente a la captación del fosfato inorgánico y que la energía derivada de la oxidación se almacena en enlaces fosfóricos ricos en energía. Más adelante, al tratar del mecanismo de acción del 2,4 dinitrofenol, volveremos sobre el problema de las relaciones existentes entre las oxidaciones y las fosforilaciones (§ 8. 2. 5).

Si se relaciona cuantitativamente el fosfato inorgánico desaparecido (micromoles) con el oxígeno consumido (micróátomos), se observa que el cociente de fosforilación (P/O) depende estrictamente de la calidad del sustrato oxidado. Trabajando con preparaciones de tejidos, en condiciones apropiadas, se ha podido demostrar que la oxidación de la coenzima I reducida (DPNH) va acompañada de una fosforilación, cuyo cociente P/O aceptable es de 3 (Lehninger, 1951) y que la oxidación del citocromo *c* reducido se caracteriza por una relación P/O cercana a la unidad (Nielsen y Lehninger, 1954). Esto ha inducido a pensar que la esterificación del fosfato inorgánico, en el curso de los procesos de óxido-reducción celular, se realiza en las reacciones intermedias que se indican en el esquema de la Figura 11.

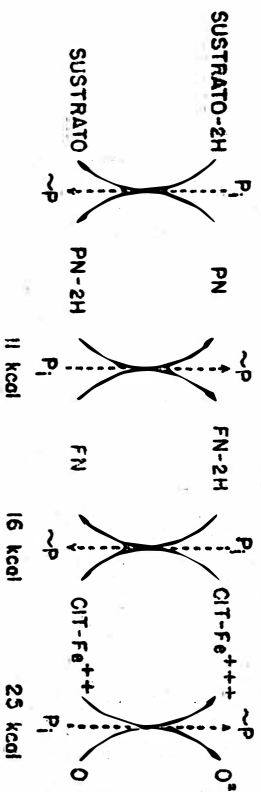


Fig. 11.—Representación esquemática del proceso de fosforilación oxidativa. P_i = fosfato inorgánico; ~P = fosfo con enlace rico en energía; PN = nucleótido piridínico; FN = nucleótido flavínico; CIT-Fe = citocromos.

El análisis termodinámico demuestra la posibilidad de que la energía derivada de las reacciones exergónicas de oxidación sea aprovechada en la creación de enlaces fosfóricos ricos en energía. En

TABLA 1

Potenciales de óxido-reducción, coenzimas utilizadas y cocientes de fosforilación de reacciones que ocurren en el metabolismo intermedio de glúcidos, lípidos y proteínas.

Modelo (Fig. 12)	Reacción	E ^o , pH 7 volt (*)	Coenzimas (**)	P/O (***)
I	Piruvato ↔ Acetato α-Quetoglutarato ↔ Succinato	— 0,630 — 0,600	DPT + DPN + DTO + CoA	4
II	Aldehído Acético ↔ Acetato Glucosa ↔ Gluconato Glucosa-6-fosfato ↔ 6-P-Gluconato	— 0,468 — 0,450 — 0,430	DPN O TPN	3
III	Isocitrato ↔ Oxalosuccinato β-Hidroxibutirato ↔ Acetacetato Etanol ↔ Aldehído Acético Lactato ↔ Piruvato Malato ↔ Oxalacetato	— 0,300 — 0,293 — 0,200 — 0,180 — 0,102	DPN O TPN	3
IV	Alanina ↔ Piruvato Glutamato ↔ α-Quetoglutarato	— 0,048 — 0,030	FAD	3
V	Butirato ↔ Crotonato Succinato ↔ Fumarato Propionato ↔ Acrilato Palmitato ↔ Oleopalmitato	— 0,025 — 0,00 + 0,010 + 0,025	FeP O FAD	2

(*) Datos tomados de la tabla confeccionada por Anderson y Plaut (1949) con datos de diversos autores.

(**) DPT = difosfotiamina; DPN = nucleótido difosfopiridínico; TPN = nucleótido trifosfopiridínico; DTO = ácido ditiooctanoico (tiónico); CoA = coenzima A; FAD = nucleótido adenínflavínico; FeP = hierroporfirina.

(***) Cociente de fosforilación, medido o hipotético.

efecto, las diferencias de potencial existentes entre los diversos sistemas redox son suficientemente grandes como para que la energía libre producida permita la creación de estos enlaces, cada uno de los cuales representa aproximadamente entre 10 y 15 mil calorías por molécula gramo (Fig. 11).

La reacción de óxido-reducción que se verifica entre el sustrato y el aceptor inmediato, suele no ser capaz de ocasionar una esterificación de fosfato, lo que es explicable desde un punto de vista termodinámico, pues la diferencia de potencial no es muy grande. En la Tabla 1 hemos agrupado los sustratos más comunes del metabolismo intermedio, en relación con los grupos funcionales que experimentan la óxido-reducción. En ella puede observarse que para las óxido-reducciones de una misma clase existe un potencial redox semejante. En la oxidación de los grupos aldehídos y alcohólicos, el potencial es cercano al de los nucleótidos piridínicos, que es de

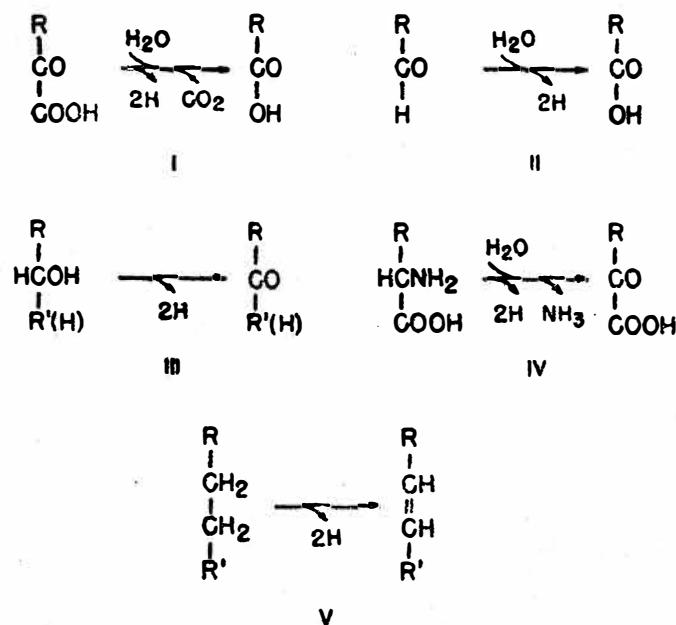


FIG. 12.—Modelos de reacciones de óxido-reducción, cuyas características aparecen en la Tabla 1.

—318 mV. Por otra parte, en la deshidrogenación del succinato, el potencial redox es de 0,00 mV, muy próximo al del citocromo *b*, que es de —0,04 mV.

En los sistemas oxidativos donde la deshidrogenasa funciona con los nucleótidos piridínicos, como en el caso de la oxidación del isocitrato, del malato y de otros sustratos, podrían formarse 3 enlaces ricos en energía por cada átomo de oxígeno. En cambio, en la oxidación del succinato, en cuyo caso los hidrógenos llegan al oxígeno por un camino más corto, puesto que faltan algunas etapas, el cociente de fosforilación es sólo 2.

En la oxidación de los quetoácidos, como el pirúvico y el α -quetoglutarico, existe un cociente de fosforilación de 4, es decir, ocurre lo que se llama una fosforilación «a nivel del sustrato». Termodinámicamente esto es comprensible, puesto que el potencial redox es muy negativo (alrededor de —600 mV), estableciéndose así una considerable diferencia de potencial con el nucleótido piridínico. El mecanismo íntimo de la formación de un enlace fosfórico rico en energía «a nivel del sustrato» está más o menos esclarecido; en efecto, hay razones para aceptar que el enlace rico en energía se establece primero entre el carbonilo y el azufre del ácido tióctico, y después se transfiere sucesivamente a la acetil-coenzima A, a la fosforil-coenzima A y al ATP (§ 3. 5. 3).

Conviene señalar el hecho de que las coenzimas que intervienen en las reacciones de óxido-reducción de los sustratos con potenciales redox semejantes, son en general las mismas, y que esas coenzimas son adecuadas a los potenciales de cada sustrato (Tabla 1).

3. 8. 3. Asimilación del anhídrido carbónico.—Algunas de las reacciones que constituyen el ciclo de Krebs pueden intervenir también en los procesos que conducen a la asimilación de anhídrido carbónico. Se ha demostrado, por medio de CO_2 marcado con carbono isotópico, que esta incorporación del CO_2 no es una propiedad característica y única de las células vegetales, sino que ocurre también en los tejidos animales (ref. en Utter y Wood, 1951). Así se ha encontrado que el glicógeno hepático de animales a los que se suministra bicarbonato marcado, contiene esos isótopos (Solomon, Vennesland, Klemperer, Buchanan y Hastings, 1941). Asimismo, se han encontrado en el glicógeno de cortes de hígado, los carbonos isotópicos del bicarbonato colocado en el medio de incubación (Topper y Hastings, 1949).

Como mecanismo de esta asimilación, se considera posible la inversión de las descarboxilaciones oxidativas del isocitrato y del malato, puesto que si el TPN se mantiene reducido por medio de

reacciones acopladas, los ácidos quetónicos, tales como el α -quetoglutarico y el pirúvico, pueden carboxilarse dando lugar a la formación de isocitrato y de malato, respectivamente (ref. en Ochoa, 1951, y en Utter y Wood, 1951).

Es posible aún que en la asimilación clorofílica ocurra una reacción parecida, manteniendo en este caso la reducción de la coenzima II mediante la fotólisis del agua, como ha sido demostrado en cloroplastos aislados (ref. en Ochoa, 1951).

3. 9. FORMACIÓN DE GLUCOSA Y DE GLICÓGENO A EXPENSAS DE METABOLITOS INTERMEDIOS.

Como ya señalamos anteriormente (§ 2. 5), los ácidos pirúvico y láctico, así como también otros componentes del metabolismo intermedio de los glúcidos, son capaces de convertirse en glicógeno y en glucosa. Los datos de que se dispone actualmente para conocer el mecanismo íntimo de estos procesos, derivan fundamentalmente de estudios realizados con átomos marcados, tanto *in vivo* como *in vitro*, y están lejos aún de haber dado completa luz sobre el problema.

Se acepta generalmente que el piruvato, y el lactato a través de este último, forman glucosa o glicógeno simplemente por inversión del ciclo glicolítico. Esta idea se apoya en los resultados obtenidos por Lardy y Ziegler (1945), quienes demostraron la posibilidad de la fosforilación directa del piruvato por medio del ATP y del fermento respectivo, reacción que era considerada como irreversible. Para someter a prueba esta hipótesis, se ha ensayado la utilización del lactato marcado isotópicamente en diferentes carbonos. Cuando el carbono marcado es el β , sería lógico esperar que la glucosa que se forma a expensas de esta molécula contenga el isótopo en los extremos 1 y 6; en cambio, si el carbono α es el marcado, el isótopo debería encontrarse en los carbonos 2 y 5 de la glucosa. Lorber, Lifson, Wood y Sakami (1948) y Lorber, Lifson, Wood, Sakami y Shreeve (1950) hicieron estos experimentos en animales enteros sometidos a ayuno, a los que suministraron por vía bucal el lactato marcado en diferentes posiciones, y analizaron posteriormente el glicógeno depositado en el hígado, de acuerdo con las interesantes técnicas de degradación ideadas por el grupo de Wood (ref. en Wood, 1951). Se pudo así observar que las unidades de glucosa derivadas del glicógeno contenían carbonos marcados tanto en las posiciones 1 y 6, como en las 2 y 5; la actividad específica de los

carbonos era prácticamente la misma cuando el lactato suministrado estaba marcado en α o en β . Se ha interpretado esta redistribución de los carbonos marcados que ocurre en el curso de la conversión del lactato en hexosa, como la consecuencia de la carboxilación del piruvato con formación de un compuesto intermedio simétrico constituido por cuatro átomos de carbono (succinato o fumarato). La descarboxilación de este compuesto formaría fosfoenolpiruvato, marcado indiferentemente en α o en β , aun cuando inicialmente haya sido marcado en uno solo de estos carbonos. Se ha sugerido que el mecanismo íntimo de este proceso corresponde a la serie de reacciones que hemos esquematizado en la Figura 13 (Utter y Kurahashi, 1954 b; Krebs, 1954).

Considerando la extensión que alcanza la redistribución de los carbonos, Lorber, Lifson, Wood, Sakami y Shreeve (1950), estiman que en las condiciones experimentales utilizadas, menos de 1/5 de los carbonos del lactato participan directamente en la formación de glicógeno, por reversión directa de la vía glicolítica. Topper y Hastings (1949) han llegado a conclusiones muy similares, empleando piruvato isotópicamente marcado en uno de los carbonos, en cortes de hígado de rata. Los resultados obtenidos muestran que la formación de glicógeno a partir de piruvato, previa incorporación de éste en el ciclo de Krebs, es 4 veces más rápida que la conversión directa.

Es interesante señalar el hecho de que cuando se estudia el acetilo derivado de piruvato marcado, no se encuentra en él esta redistribución de los átomos de carbono, sino que el piruvato marcado en α da acetilo con el isótopo en el carboxilo, y el acetilo proveniente de piruvato marcado en β contiene el isótopo en el metilo (Shreeve, 1952). Esto obliga a pensar que el compuesto de tres átomos de carbono que proviene del ciclo de Krebs (¿fosfoenolpiruvato?) y que va a ser utilizado en la formación de glicógeno, se diferencia en algo del piruvato (¿libre?) que va a generar acetilo, y que el primero no se transforma en este último. Este conjunto de hechos indica que el proceso de la glicogénesis a expensas de compuestos de tres átomos de carbono, dista aún de estar completamente resuelto.

La producción de glicógeno a partir de propionato marcado, demuestra que también se produce la redistribución de los átomos de carbono en las posiciones α y β , que en este caso es completa. Este hecho se ha interpretado como la consecuencia de la formación

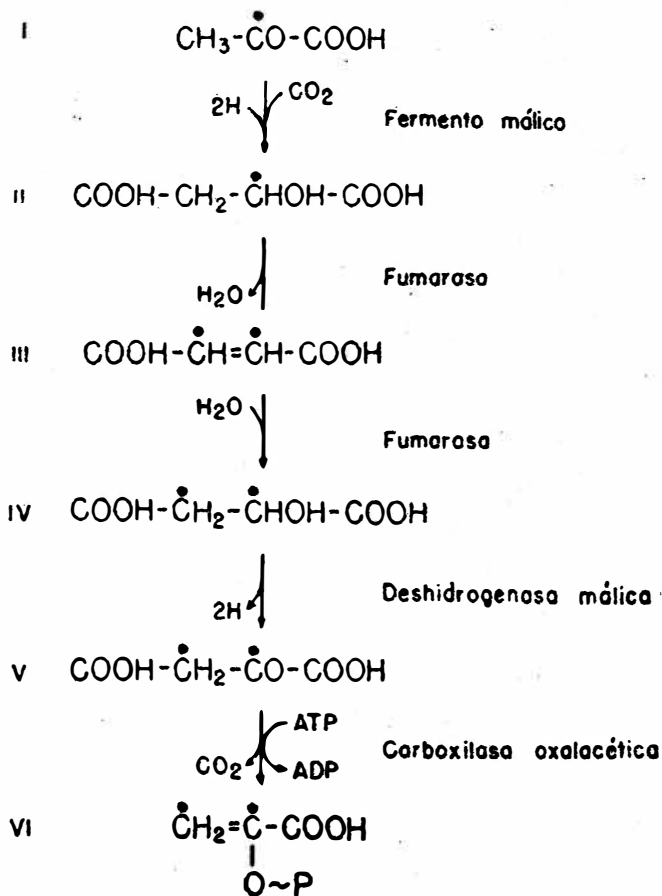


FIG. 13.—Vía probable de la fosforilación indirecta del ácido pirúvico.

I, ácido pirúvico marcado en C_2 ; II, ácido málico marcado en C_2 ; III, ácido fumárico marcado en C_2 y C_3 ; IV, ácido málico marcado en C_2 y C_3 ; V, ácido oxalacético marcado en C_2 y C_3 ; VI, ácido fosfoenolpirúvico marcado en C_2 y C_3 .

intermedia de ácidos dicarboxílicos de cuatro átomos de carbono (Lorber, Lifson, Sakami, y Wood, 1950). Según estos autores, la carboxilación del ácido propiónico sería directa, transformándolo en ácido succínico, como ha sido demostrado en algunos microorganismos.

Los hechos relatados explican la capacidad glicogenética de

todos los intermediarios del ciclo cítrico, puesto que todos ellos pueden dar lugar a la formación de piruvato o fosfoenolpiruvato, el cual llega a producir glicógeno.

3. 10. INTERCONVERSIÓN DE GLÚCIDOS, LÍPIDOS Y PRÓTIDOS.

De acuerdo con los esquemas del metabolismo intermedio que hemos revisado, se puede comprender fácilmente cuáles son las posibles vías que siguen los diferentes principios inmediatos de la alimentación hasta llegar a convertirse unos en otros, con el objeto de satisfacer las necesidades cambiantes del organismo.

3. 10. 1. *Conversión de hidratos de carbono en grasas.*—La formación de grasas comprende fundamentalmente la producción de glicerol y de ácidos grasos. El *glicerol* puede derivar del dihidroxiacetónfosfato, mediante una reducción catalizada por la glicerofosfato-deshidrogenasa que trabaja con DPNH y que se encuentra en el hígado y en otros tejidos (Baranowski, 1949). El glicerol puede derivar también de la reducción del aldehído glicérico bajo la acción catalítica de una deshidrogenasa que requiere coenzima I reducida y que ha sido encontrada en extractos de hígado de rata y de cerdo (Wolf y Leuthardt, 1953).

La cantidad de glicerol presente en la célula sería un factor limitativo en la formación de grasas neutras y repercutiría en la síntesis de ácidos grasos. Esta hipótesis explica el aumento que experimenta la síntesis de ácidos grasos a expensas de acetato, cuando se adicionan *in vitro* algunos precursores glucídicos del glicerol (ref. en Popjak, 1951).

Con respecto a la síntesis de *ácidos grasos* a partir de hidratos de carbono, se acepta en general que ella se realiza siguiendo la vía del acetilo, derivado éste de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico. Desde luego, está demostrado que los ácidos grasos pueden formarse a expensas de acetato, gracias a una condensación múltiple; esta demostración ha sido proporcionada por los experimentos realizados con acetato marcado y análisis ulterior de los carbonos de los ácidos grasos (ref. en Bloch, 1952). Cuando se estudia la conversión de la glucosa, del piruvato o del lactato marcados, en ácidos grasos, y se investiga la localización de los isótopos en estos últimos, se obtienen resultados cuya explicación es fácil si se acepta la formación previa de un compuesto de dos átomos de carbono. Así, cuando se utiliza glucosa marcada en el carbono 1,

los ácidos grasos de los tejidos animales contienen los isótopos en los carbonos pares, lo cual indica que se ha llegado a la formación de piruvato y de unidades de acetilo marcadas en el metilo (ref. en Bloch, 1952). Cuando los precursores son el lactato o el piruvato, sólo ha sido posible obtener ácidos grasos marcados, tanto en el animal entero como en cortes de hígado, sólo en el caso en que los carbonos isótopos se encuentren en las posiciones 2 ó 3 y no cuando el átomo marcado está en el carboxilo (Anker, 1952; Felts, Chaikoff y Osborn, 1951). Aún más, Anker (1952) ha demostrado que el piruvato marcado en el carbono 2 aparece en los carbonos impares de los ácidos grasos en toda la longitud de la cadena.

Los acetilos formados a expensas del piruvato pueden ser utilizados también en otras síntesis biológicas, según lo prueban los experimentos de Shreeve (1952) sobre la formación de ácido N-acetil-fenil-aminobutírico, y de Anker (1952) sobre la biosíntesis del colesterol.

3. 10. 2. Conversión de ácidos grasos en hidratos de carbono.—

Los experimentos con sustratos marcados indican claramente que los carbonos de los ácidos grasos se encuentran incorporados al glicógeno, aún en aquellas condiciones en que no existe una síntesis neta de este polisacárido. Como vía de esta incorporación se acepta que los acetilos derivados de la oxidación de los ácidos grasos se unen con el oxalacetato para formar citrato. Se sabe que en el ciclo de Krebs hay intercambio de los carbonos a nivel de las moléculas simétricas, al mismo tiempo que hay desaparición de un acetilo, de modo que es posible la incorporación de átomos marcados, aun cuando una cantidad equivalente de acetilos se haya oxidado, o sea, sin que se produzca una síntesis absoluta de hidratos de carbono (Lifson, Lorber, Sakami y Wood, 1948).

La acetona, que debe ser considerada como un producto de la degradación de los ácidos grasos, da lugar a la formación de glicógeno en el hígado, siguiendo al parecer una doble vía: por una parte la molécula se escindiría, transformándose en compuestos de uno y dos átomos de carbono (¿formiato? y ¿acetato?), y por otra, ella sería oxidada hasta piruvato. Ambos caminos tendrían como intermedio probable el propanodiol o el propanodiolfosfato (ref. en Wood, 1951).

3. 10. 3. Conversión de aminoácidos en hidratos de carbono.— Se acepta que la formación de glúcidos a expensas de aminoácidos

se efectúa gracias a la producción de derivados comunes en el metabolismo intermedio de ambos tipos de sustancias. Así, la desaminación de la L(+)-alanina, del L(+)-aspartato y del L(+)-glutamato produce, respectivamente, piruvato, oxalacetato y α -quetoglutarato, tres moléculas reconocidamente glicogénicas (§ 3. 8). Estas reacciones de desaminación, que se realizan principalmente en virtud de procesos de transaminación (ref. en Meister, 1955), son de carácter reversible, lo que explica el hecho de que los átomos de carbono de los glúcidos marcados puedan aparecer en las proteínas. En el caso del ácido L(+)-glutámico, existe una deshidrogenasa específica, presente en el hígado, en el riñón y en el corazón, que lo transforma en ácido α -quetoglutarico (ref. en Fruton y Simmonds, 1953).

Diversos aminoácidos producen ácido L(+)-glutámico como producto intermedio de su metabolismo, por lo cual forman glicógeno siguiendo esta vía; tal es el caso de la prolina, la hidroxiprolina, la histidina y la arginina (Fig. 14).

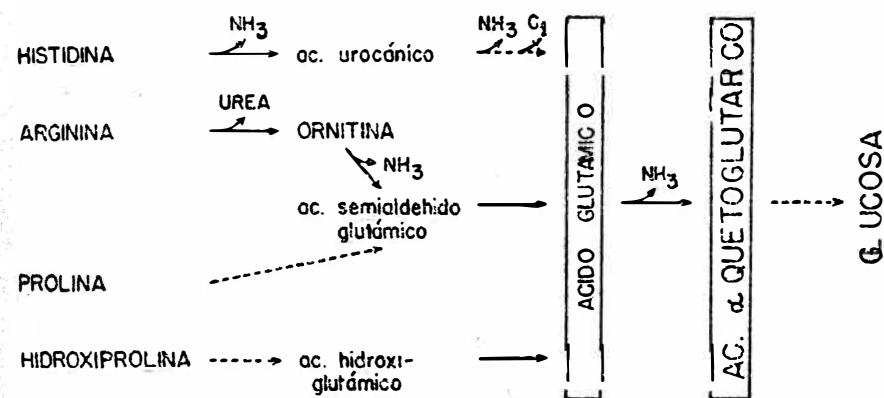


FIG. 14.—Gliconeogénesis proteica vía ácido α -quetoglutarico. Líneas interrumpidas representan omisión de etapas intermedias.

Otros aminoácidos, como la serina, la cisteína, la glicina, la valina, la treonina, la isoleucina y la norleucina, se desaminan y luego dan lugar a la formación de piruvato (Fig. 15), a través de diversas etapas intermedias, de donde proviene su capacidad para formar glicógeno (ref. en Fruton y Simmonds, 1953, y en West y Todd, 1955).

También es posible que la tirosina y la fenilalanina, aun cuando son considerados como aminoácidos quetogenéticos, logren for-

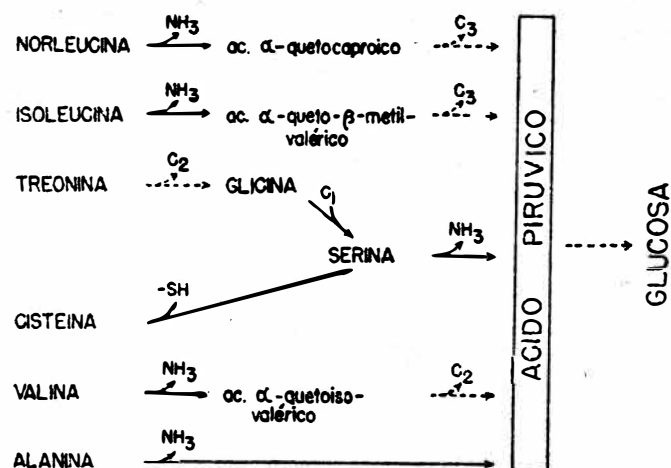


FIG. 15.—Gliconeogénesis proteica vía ácido pirúvico. Líneas interrumpidas representan omisión de etapas intermedias.

mar glicógeno, pues sus transformaciones en el hígado conducen a la formación de fumarato y de acetacetato (ref. en Fruton y Simmonds, 1953).

CAPÍTULO 4

INFLUENCIA DE METABOLITOS GLUCIDICOS EN LA RESPIRACION DEL HIGADO

4. 1. Como un criterio de la oxidación de una determinada substancia en un tejido, se ha utilizado el aumento que experimenta el consumo de oxígeno de un corte de este tejido cuando se coloca en presencia de ella. La magnitud de este aumento constituye una medida aproximada de la capacidad del tejido para quemar el sustrato. Como veremos luego, este criterio no es absoluto, pues la aplicación de nuevas técnicas ha mostrado algunas incertidumbres del procedimiento, de manera que sus resultados deben analizarse cuidadosamente e interpretarse en conjunto con los obtenidos en estudios de otro tipo.

En este capítulo se estudiará la capacidad que poseen los cortes de hígado de rata para oxidar glucosa, fructosa y algunos de sus ésteres fosfóricos, expresada en las variaciones del consumo de oxígeno, medido en aparatos de Warburg.

4. 2. INFLUENCIA DE LA GLUCOSA.

4. 2. 1. La adición de glucosa al medio de incubación no produce una modificación significativa en el consumo de oxígeno de los cortes de hígado de rata, con respecto a los testigos sin sustrato. En efecto, el estudio en conjunto de los resultados de nuestros experimentos (Tabla 2), revela que la presencia de glucosa en concentraciones de 30 mM/l produjo, en 40 experimentos realizados en solución de Krebs, una modificación de $+ 1,2 \pm 0,7\%$, valor que no difiere significativamente de cero. El incremento de la concentración de glucosa hasta 60 mM/l, tampoco consigue aumentar el consumo de oxígeno, como puede observarse en los datos que aparecen en la Tabla 3.

TABLA 2

Influencia de diferentes sustratos sobre el consumo de oxígeno, en cortes de hígado de rata incubados durante 60 minutos en solución de Krebs ().*

Sustrato agregado (**)	N.º de experimentos	Modificación del consumo de O ₂ (***) %
Glucosa	40	+ 1,2 ± 0,7
Fructosa	20	+ 18,9 ± 2,1
Glucosa-1-fosfato	18	+ 9,6 ± 1,4
Glucosa-6-fosfato	18	+ 13,1 ± 1,1
Fructosa-6-fosfato	14	+ 18,3 ± 2,5
Fructosa-1,6-difosfato	15	+ 23,3 ± 2,0
Piruvato	10	+ 22,6 ± 2,6
α-Quetoglutarato	1	+ 24,2
Malato	1	+ 37,4
Succinato	1	+ 250,0

(*) Conjunto de datos parcialmente publicados (Niemeyer, 1951; Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953; Niemeyer, Figueroa y Figueroa, 1954; Niemeyer y Figueroa, 1955 a; Niemeyer y Figueroa, 1955 b).

(**) La concentración de los sustratos ensayados fué de 30 mM/l.

(***) Modificación con respecto al testigo sin sustrato; media aritmética y su error típico.

TABLA 3

Influencia de diversas concentraciones de glucosa sobre el consumo de oxígeno, en cortes de hígado de rata ().*

Experimento N.º	Concentración de glucosa (mM/l)				
	15	30	40	45	60
1	—	+ 4,3	- 1,1	—	—
2	+ 2,1	+ 6,2	—	+ 2,1	+ 6,2
3	- 4,2	+ 0,6	—	+ 1,2	- 1,8
4	—	- 5,6	- 1,1	—	—

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa, no publicados.

Cada cifra representa el tanto por ciento en que se modifica el consumo de oxígeno con respecto al testigo sin sustrato.

Estos resultados no hacen sino confirmar lo establecido por Warburg (1928) y observado con posterioridad por otros investigadores, quienes han trabajado con diferentes medios salinos de incubación y con diversos métodos manométricos (Crabtree, 1929; Dickens y Greville, 1933; Kisch, 1934; Himwich, Fazikas, Barker y Hurburt, 1934; Edson, 1936 b; Elliot, Greig y Benoy, 1937; Marsh, 1937; Tipton, 1941; Ugalde, 1943; Herrera, 1945; Olson, 1951). Resultados similares se han obtenido también en hígado de conejo (Wainio, 1947) y de cobayo (Quastel y Wheatley, 1933). Generalmente la glucosa ha sido empleada en concentración de 11 mM/l, o sea algo más baja que la utilizada en nuestros experimentos.

4. 2. 2. En oposición a lo que ocurre en el hígado, la glucosa ocasiona un aumento de la respiración en cortes de otros tejidos. En algunos órganos de rata, como el cerebro (Dickens y Greville, 1933; Himwich, Fazikas, Barker y Hurburt, 1934; Elliot, Greig y Benoy, 1937; Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar), la retina (Dickens y Greville, 1933) y el testículo (Dickens y Greville, 1933; Shorr, Loebel y Richardson, 1936; Elliot, Greig y Benoy, 1937; Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar), el incremento es muy grande, llegando en algunos experimentos hasta triplicar el consumo de oxígeno. En cerebro de conejo (Dickens y Greville, 1933) y en retina de buey (Kisch, 1934; Greig, Munro y Elliot, 1939), se han obtenido resultados similares.

El aumento del consumo de oxígeno en otros tejidos de la rata, como el riñón (Crabtree, 1929; Dickens y Greville, 1933; Kisch, 1934; Himwich, Fazikas, Barker y Hurburt, 1934; Shorr, Loebel y Richardson, 1936; Marsh, 1937; Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar) y el bazo (Dickens y Greville, 1933; Kisch, 1934) es menor, fluctuando alrededor del 20%.

El tejido muscular estriado, en cambio, se asemeja al hígado. La mayor parte de los autores no observa diferencia en el consumo de oxígeno del diafragma de rata incubado en medios con y sin glucosa (Kisch, 1933; Himwich, Fazikas, Barker y Hurburt, 1934; Marsh, 1937; Beloff-Chain, Chain, Bovet, Pocchiari, Catanzaro y Longinotti, 1953). Tampoco en fibras musculares aisladas de perro se ha observado un cambio de la respiración por la adición de glucosa (Richardson, Shorr y Loebel, 1936). En el músculo cardíaco de rata, por el contrario, se observa un aumento de la respiración

(Kisch, 1934), lo que no ocurre en el corazón entero de batracio (Niemeyer y Lira, 1946).

El tiroides parece comportarse de igual manera que el hígado y el músculo estriado (Cruz Coke, Niemeyer y Marich, 1946).

4. 2. 3. Este conjunto de datos experimentales hicieron suponer a Cruz Coke (1942) que una de las características del metabolismo del hígado es su escasa o nula capacidad de oxidar hidratos de carbono. El notable incremento de la respiración producido por los ácidos grasos (Quastel y Wheatley, 1933; Niemeyer, 1942) hizo pensar que la célula hepática utiliza preferentemente este tipo de sustrato con fines energéticos.

Cruz Coke (1942) ha sugerido asimismo la posibilidad de que cada tejido oxide preferentemente un sustrato determinado, del cual obtiene la energía que requieren sus diversas funciones. En apoyo de esta idea puede citarse el hecho de que el tejido nervioso (Quastel, 1939) y el músculo estriado (Gemmell, 1942) obtienen su energía principalmente de la glucosa; de que el riñón posee una elevada capacidad para oxidar amino-ácidos (Krebs, 1935; Rodney y Garner, 1938; Kisch, 1934; Cruz Coke, Niemeyer y Fernández, 1944) y de que el miocardio parece utilizar el ácido láctico (ref. en Rojas-Villegas, 1936). La comprobación de esta hipótesis de trabajo permitiría comprender mejor el hecho de que en los diversos tejidos adquieran diferente importancia algunos cofactores de la actividad enzimática, así como la diversa sensibilidad a fármacos que presentan los distintos tejidos.

4. 2. 4. El cuociente respiratorio (C. R.) de los distintos tejidos es diferente, lo que puede constituir un indicio de que utilizan diversos sustratos. La Tabla 4 muestra que algunos tejidos, como el cerebro y la retina, tienen un C. R. de 1,0, característico de la combustión de glúcidos; en los demás tejidos el C. R. es menor que 1,0, lo que indica la oxidación de una mezcla de sustratos. El valor correspondiente al hígado es el más bajo, y es aún menor en hígados provenientes de animales en ayuno. Los resultados de la medida del C. R. obtenidos en diversos órganos por numerosos autores, empleando animales, técnicas y medios de incubación diferentes, son en general concordantes (Dickens y Simer, 1931; Himwich, Fazikas, Barker y Hurburt, 1934; Gemmell y Holmes, 1935; Shorr, Loebel y Richardson, 1936; Elliot, Greig y Benoy, 1937; Marsh, 1937;

Stotz, Harrer, Schultze y King, 1937; Tipton, 1939 y 1941). La mayoría de las mediciones se han hecho en soluciones salinas que contienen glucosa al 0,2% (11 mM/l); pero los resultados obtenidos en ausencia de sustrato son del mismo orden.

TABLA 4

Cuociente respiratorio de cortes de diversos tejidos de rata, incubados en medio salino con glucosa ().*

Tejido	C. R.
Corion	1,02
Retina	1,00
Corteza cerebral	0,99
Testículo	0,94
Bazo	0,89
Glándula submaxilar	0,87
Mucosa intestinal	0,85
Riñón	0,85
Hígado	0,79
Hígado (ayuno)	0,61

(*) Datos de Dickens y Simer (1930). La concentración de glucosa es de 11 mM/l.

4. 2. 5. Podría también interpretarse, la incapacidad de la glucosa para modificar el consumo de oxígeno en cortes de hígado, suponiendo que los mecanismos enzimáticos responsables de la oxidación de los hidratos de carbono ya están saturados por la combustión del glicógeno.

Con el objeto de conocer la influencia que ejerce el contenido de glicógeno en el efecto de la glucosa, Cruz Coke y Niemeyer (Niemeyer, 1942) estudiaron el consumo de oxígeno en cortes de hígado de ratas sometidas a diversas condiciones que ocasionan una disminución de sus reservas de glicógeno. Observaron así que la glucosa tampoco modifica el consumo de oxígeno en cortes de hígado de animales sometidos a un ayuno previo. Los estudios realizados en ratas en las cuales el glicógeno hepático estaba en niveles bajos, ya sea por suprarrenalectomía, por choque insulínico o por ambas condiciones simultáneas, mostraron asimismo la incapacidad de la glucosa para aumentar significativamente el consumo de oxígeno en

los cortes de hígado. En el hipertiroidismo experimental el contenido de glicógeno de los cortes de hígado es tan reducido, que si constituyera el único sustrato, no podría mantener el consumo de oxígeno sino en los primeros minutos de incubación; sin embargo, en estas condiciones, el agregado de glucosa tampoco da lugar a un incremento de la respiración (Niemeyer, 1951).

Por otra parte, en cortes de hígado proveniente de animales en ayunas hemos observado que aún cuando el glicógeno prácticamente ha desaparecido, la respiración se mantiene constante en el curso de una incubación de dos a tres horas, y la adición de glucosa no modifica el consumo de oxígeno (Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953).

Puede, pues, rechazarse la interpretación de que la falta de efecto de la glucosa se deba a que la presencia de glicógeno mantiene saturados los sistemas enzimáticos que intervienen en su degradación.

4. 2. 6. La capacidad del hígado para combustionar glucosa ha sido estudiada directamente por Olson (1951), utilizando glucosa marcada. Este autor, colocando cortes de diversos tejidos en un medio de incubación que contenía glucosa uniformemente marcada con C^{14} , y analizando el anhídrido carbónico producido, encontró que en el hígado la proporción de $C^{14}O_2$ correspondía solamente al 2% del total de anhídrido carbónico producido en la respiración. Este fenómeno diferencia el hígado de otros tejidos ensayados, como el cerebro, en el cual la casi totalidad del CO_2 proviene de la glucosa marcada. En la Tabla 5, que resume los resultados referidos, puede

TABLA 5

Producción de $C^{14}O_2$ a partir de glucosa- C^{14} (10 mM/l) en cortes de diversos tejidos de rata ().*

Tejido	$QC^{14}O_2$ (**)
Cerebro	+ 10,5
Corazón	+ 2,8
Hepatoma	+ 2,1
Hígado	+ 0,2

(*) Datos de Olson (1951).

(**) μl de $C^{14}O_2$ producidos por mg de tejido seco por hora.

observarse además que los hepatomas obtenidos por ingestión de azotolueno se comportan de manera claramente diversa al hígado normal, semejándose en esto a otros tejidos. El análisis de los datos publicados por otros investigadores que han incubado cortes de hígado de rata en presencia de glucosa marcada, con diferentes propósitos experimentales, muestra resultados análogos a los obtenidos por Olson (Masoro, Chaikoff, Chernick y Fetts, 1950; Weinhouse, 1951; Zamecnik, Lotffield, Stephenson y Steele, 1951).

Los estudios con glucosa marcada dan, pues, evidencia al hecho de que este azúcar es oxidado en forma muy limitada por la célula hepática y que, al menos en cortes sobrevivientes, no constituye una fuente energética apreciable del hígado. La pequeña cantidad de glucosa oxidada debe reemplazar una proporción correspondiente de sustratos endógenos que el tejido utiliza en condiciones basales.

4. 2. 7. La falta de oxidación de la glucosa por el hígado aparece confirmada, además, en experimentos de competencia de sustrato. En la Tabla 6 se exponen algunos experimentos no publicados de

TABLA 6

Influencia de la glucosa y del piruvato sobre la oxidación del $CH_3C^{14}OOH$ en cortes de hígado y de riñón de rata ().*

N.º de exp.	Tejido	Acetato- C^{14} C/min/mg (**)	Acetato- C^{14} + Glucosa		Acetato- C^{14} + Piruvato	
			C/min/mg (**)	Δ % (***)	C/min/mg (**)	Δ % (***)
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
3	Hígado	2,82	2,89	+ 2,5	2,00	- 29,0
1	Riñón	8,77	7,10	- 19,1	2,82	- 68,0

(*) Datos de Niemeyer y Sinex, no publicados.

La concentración de los sustratos fué de 20 mM/l. La actividad del acetato correspondía aproximadamente a 1 000 cuentas por minuto por cada 2 ml de medio de incubación.

(**) Cuentas por minuto medidas en el CO_2 producido en una hora de incubación por mg de tejido seco.

Tanto por ciento de modificación con respecto a los datos de la columna 1.

Niemeyer y Sinex, en los cuales se estudió la producción de $C^{14}O_2$, en cortes de hígado y de riñón de rata, suspendidos en solución salina que contenía $CH_3C^{14}COONa$, solo o adicionado de glucosa o de piruvato. De estos datos se deduce que la presencia de piruvato disminuye apreciablemente la producción de $C^{14}O_2$ en ambos tejidos, y que este efecto es más acentuado en el riñón ($-68,0\%$) que en el hígado ($-29,0\%$). En cambio, la presencia de glucosa inhibe la producción de $C^{14}O_2$ sólo en el riñón ($-19,1\%$) y no la modifica apreciablemente en el hígado ($+ 2,5\%$). Estos resultados indican que el piruvato se oxida en ambos órganos produciendo una inhibición de la combustión del acetato, lo que puede interpretarse como la consecuencia de una dilución del metabolito intermedio común (acetil-CoA). En cambio, la glucosa agregada sería oxidada en el riñón y no en el hígado, puesto que en este último no se observa el efecto de dilución.

Hace alrededor de 20 años, algunos investigadores habían realizado experimentos de competencia de sustrato con otros propósitos y empleando otras técnicas de estudio. Sus resultados pueden interpretarse en la misma forma en que interpretamos los nuestros. En efecto, Quastel y Wheatley (1933) demostraron que en cortes de hígado de cobayo, la oxidación de los ácidos grasos, medida por la aparición de acetacetato, no era modificada por la presencia de glucosa. Edson (1936 b) obtuvo resultados similares en hígado de rata, comprobando además que el piruvato y el lactato reducían apreciablemente la producción de acetacetato derivado del ácido hexanoico.

Del conjunto de los datos presentados puede concluirse que el tejido hepático no oxida glucosa exógena, sino en muy escasa proporción, en lo cual difiere de la mayoría de los otros órganos estudiados.

4. 3. INFLUENCIA DE LA FRUCTOSA.

En oposición a lo que ocurre con la glucosa, la adición de fructosa al medio en que se incuban cortes de hígado de rata, ocasiona un incremento apreciable del consumo de oxígeno. En efecto, en 20 experimentos no publicados, hemos encontrado una modificación de $+ 18,9 \pm 2,1\%$ (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con los comunicados por Kisch (1934) y por Marsh (1937). En cambio, Dickens y Greville (1933), en tres experimentos, no observaron modificación apreciable del consumo de oxígeno; pero sí una elevación del cociente respiratorio que interpretaron como el reflejo de una

oxidación de la fructosa. Otros tejidos, como el cerebro, la retina, el testículo y el riñón, muestran un incremento considerable del consumo de oxígeno en presencia de fructosa, aumento que es del mismo orden de magnitud, o superior, al que experimentan por adición de glucosa (Dickens y Greville, 1933; Kisch, 1934; Marsh, 1937; Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar). Por otra parte, en cortes de bazo, la fructosa ocasiona sólo un aumento discreto (Dickens y Greville, 1933) o nulo (Kisch, 1934; Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar) de la respiración, y en el músculo estriado (diafragma de rata) no la modifica sensiblemente (Marsh, 1937).

4. 4. INFLUENCIA DE LOS HEXOSAFOSFATOS.

4. 4. 1. Los diversos ésteres fosfóricos de la glucosa y de la fructosa que hemos ensayado, producen un aumento del consumo de oxígeno de los cortes de hígado de rata (Tabla 2). Usando los sustratos en concentración de 30 mM/l, los promedios de aumento con sus respectivos errores típicos, expresados en tanto por ciento, fueron los siguientes: $9,6 \pm 1,4$ con G-1-P; $13,1 \pm 1,1$ con G-6-P; $18,3 \pm 2,5$ con F-6-P, y $23,3 \pm 2,0$ con F-di-P. Los efectos son menores en experimentos en los cuales se utilizan concentraciones de hexosafosfatos de 20 ó 10 mM/l y no son mayores cuando la concentración se lleva a 40 mM/l (Niemeyer, 1951).

El efecto de los hexosafosfatos en la respiración de tejidos había sido muy poco estudiado. Edson (1936 b), en un experimento aislado en cortes de hígado de rata, observó que el F-di-P en concentración de 40 mM/l produjo un estímulo del 14% en el consumo de oxígeno. Wainio (1947), en un experimento único realizado en hígado de conejo, encontró con este mismo sustrato un aumento del 18,5%. En cambio, este último autor no observó modificación de la respiración con G-6-P ni con F-6-P en un experimento realizado con cada sustrato. Es de interés consignar el hecho de que Wainio (1947) empleó alrededor de 250 mg de tejido en 2 ml de solución salina, pues en experimentos preliminares nuestros, en los cuales empleamos una cantidad similar de tejido (entre 200 y 300 mg), pudimos comprobar que la modificación del consumo de oxígeno producida por los hexosafosfatos era inferior a la observada cuando se emplean alrededor de 100 mg, que es la cantidad adecuada para un volumen de 2 ml de medio de incubación.

Beloff-Chain, Chain, Bovet, Pocchiari, Catanzaro y Longinotti

(1953), estudiaron la influencia de diversos hexosafosfatos en la respiración del diafragma de rata. El G-1-P al 1% produjo un incremento de un 60% en el consumo de oxígeno; en cambio, ni el G-6-P ni el F-di-P ni la glucosa, produjeron una modificación apreciable. Los autores no proponen explicación de estos hechos. Zierler, Levy y Andres (1953) también encontraron un aumento de la respiración (16%) en presencia de G-1-P en menor concentración (8 a 17 mM/l).

4. 4. 2. Existe la posibilidad de que la modificación del consumo de oxígeno producida por los hexosafosfatos en nuestros experimentos, fuera debida a condiciones inespecíficas, como pudiera ser el aumento del fosfato inorgánico del medio. Como veremos más adelante (§ 7. 1), durante la incubación se liberan cantidades importantes de fosfato proveniente de los ésteres. Con el objeto de resolver esta duda, se hicieron algunos experimentos en los que se modificó la concentración de fosfato inorgánico del medio. Los resultados que aparecen consignados en la Tabla 7, muestran que un

TABLA 7

Influencia de la concentración de fosfato inorgánico del medio sobre el consumo de oxígeno en cortes de hígado de rata ().*

Exp. N.º	Consumo de oxígeno (μ l/100 mg tejido/hora)							
	sin sustrato				con glucosa (30 mM/l)			
	8	16	24	32	8	16	24	32
1	169	174	179	—	161	164	168	—
2	167	166	170	—	168	177	183	—
3	—	172	—	174	—	—	—	—
4	—	179	—	189	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	207	—	196

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa (1953). Las cifras que encabezan las columnas corresponden a la concentración de fosfato inorgánico del medio (mM/l).

aumento de la concentración de fosfato desde 16 mM/l, que contiene la solución de Krebs, a 24 o 32 mM/l, no altera significativamente el consumo de oxígeno. Tampoco la disminución a 8,5 mM/l

cambia la respiración. Por lo demás, en algunos experimentos con hexosafosfatos en los cuales se suprimió el fosfato inorgánico de la solución de Krebs y había sólo el fosfato liberado por los ésteres, el incremento de la respiración producida por los sustratos fué del mismo orden que el observado en los experimentos testigos.

4. 5. INFLUENCIA DEL PIRUVATO Y DE OTROS METABOLITOS.

Confirmando los datos publicados por otros investigadores (Kisch, 1934; Edson, 1936 b; Rosenthal, 1937; Tipton, 1941; Olson, 1951), hemos encontrado que la adición de piruvato, en concentración de 30 mM/l, produce un aumento en el consumo de oxígeno en cortes de hígado de rata (Niemeyer y Figueroa, 1955 a). El promedio de este incremento en 10 experimentos fué de $+ 22,6 \pm 2,6\%$. Los datos consignados en la Tabla 2 muestran además que la presencia de algunos componentes del ciclo cítrico de Krebs ocasiona un incremento de la respiración (Niemeyer y Figueroa, 1955 a), lo que concuerda con lo observado por otros investigadores (Edson, 1936 a; Rosenthal, 1937; Tipton, 1941).

4. 6. DISCUSIÓN.

Los resultados experimentales analizados en los párrafos anteriores muestran que la adición de glucosa no modifica el consumo de oxígeno en cortes de hígado de rata, y que la presencia de fructosa, de hexosafosfatos y de otros metabolitos, como el ácido pirúvico y algunos componentes del ciclo de Krebs, produce un aumento significativo de su respiración.

Estos hechos hacen pensar que el factor limitativo en la oxidación de la glucosa en el hígado está constituido por la dificultad de su conversión en G-6-P. La glucosa no se fosforilaría, pues, con una velocidad tal que consiga una concentración intracelular de G-6-P, suficiente para que actúen los fermentos que inician su degradación. En efecto, si se añade G-6-P, con lo que se hace innecesaria esta primera etapa y se consigue una concentración suficiente, se observa un incremento apreciable de la respiración de los cortes.

Podría pensarse que el factor limitativo en estas condiciones experimentales fuera una insuficiente concentración de ATP. En ese caso, otras reacciones que también requieren la presencia de ATP deberían sufrir la misma suerte. Sin embargo, la fructosa, sustancia que, según los conocimientos actuales, también necesita ATP en la primera etapa de su utilización (§ 3. 2), da lugar

a un aumento importante en el consumo de oxígeno. Por otra parte, es sabido que los cortes de hígado en condiciones semejantes a las empleadas en nuestro estudio, son capaces de realizar diversos procesos de síntesis que necesitan energía proporcionada por el ATP.

Estas consideraciones hacen pensar, más bien, que el factor limitativo en la oxidación de la glucosa es la escasa actividad de la glucoquinasa. Apoyan este punto de vista los interesantes experimentos de Long (1951), quien estudia la actividad hexoquinásica de diversos tejidos de rata, y demuestra que es el hígado el órgano que presenta el valor más bajo (Tabla 8). Estos resultados sugiere-

TABLA 8

Actividad hexoquinásica en homogenizados de diferentes tejidos de rata ().*

Tejido	Actividad (**)
Cerebro	27,1
Estómago	17,7
Colon	17,2
Corazón	14,9
Testículo	14,0
Intestino delgado	11,7
Ciego	10,9
Utero	9,3
Riñón	7,5
Músculo	6,0
Bazo	6,0
Páncreas	5,9
Pulmón	4,3
Hígado	1,4

(*) Datos de Long (1951).

(**) Expresada en μ l de glucosa desaparecida por mg de tejido seco y por hora.

ron a Long que la vía glucosa $\rightarrow$ G-6-P $\rightarrow$ G-1-P $\rightarrow$ glicógeno, no sería importante en el hígado. Volveremos más adelante sobre este importante problema.

Olson (1951) ha investigado también la reacción limitativa de la oxidación de la glucosa en el hígado. Trabajando con homogeni-

zados de hígado de rata en anaerobiosis y en presencia de ATP, midió la producción de ácido láctico a partir de glucosa y de diversos hexosafosfatos. Los resultados obtenidos lo indujeron a pensar que la etapa limitativa era la catalizada por la fosfohexoquinasa, por cuanto con F-di-P obtuvo valores de ácido láctico superiores a los que suministran el G-6-P y el F-6-P. En apoyo de esta interpretación está el hecho de que la actividad 6-fosfofructoquinásica es mucho menor en el hígado que en otros órganos, como cerebro y corazón, según puede observarse en la Tabla 9.

TABLA 9

Actividad de la 6-fosfofructoquinasa en homogenizados de diversos tejidos de rata ().*

Tejido	Actividad (**)
Corazón	122
Cerebro	100
Hígado	22

(*) Datos de Olson (1951).

(**) Unidades por ml de homogenizados.

En experimentos no publicados, en los que hemos utilizado homogenizados de hígado en aerobiosis, hemos comprobado que aún en presencia de ATP exógeno, la glucosa no incrementa el consumo de oxígeno, y que, tal como sucede en los cortes, el G-6-P y el F-6-P producen un aumento de la respiración. La magnitud de este aumento depende en cierto grado de la relación que se obtiene entre la concentración de ATP agregado y la cantidad de tejido. En las mismas condiciones experimentales, el F-di-P produce un incremento de la respiración algo superior al ocasionado por los hexosamonofosfatos, el que se observa aún sin adición de ATP. Es perfectamente posible, entonces, que en el hígado, tanto la glucoquinasa como la fosfohexoquinasa tengan escasa actividad.

INFLUENCIA DE METABOLITOS GLUCIDICOS SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO EN EL HIGADO

5. 1. En el proceso de la degradación de los azúcares, aún en aerobiosis se produce en los tejidos una cierta cantidad de ácido láctico, que resulta de la reducción del ácido pirúvico. Por este motivo, la cantidad de ácido láctico que aparece en el medio donde se incuban cortes de tejido puede considerarse como un índice de la degradación de sustratos glucídicos. La medida del ácido láctico producido en presencia de estos sustratos, proporciona una información adicional sobre la capacidad de un tejido para utilizar cada uno de ellos. Esto nos ha inducido a estudiar la influencia de la glucosa, la fructosa y algunos de sus ésteres fosfóricos sobre la formación de ácido láctico en cortes de hígado de rata. Hemos determinado el ácido láctico por el método químico de Barker y Summerson (1941), modificado por Hullin y Noble (1953), pues este método tiene mayor sensibilidad y especificidad que los procedimientos manométricos. En efecto, estos últimos miden sólo la producción de valencias ácidas que no siempre guardan una estricta correspondencia con el ácido láctico liberado (Rosenthal, 1929; Elliot, Greig y Benoy, 1937). Este inconveniente es especialmente importante cuando se trabaja con ésteres fosfóricos, ya que la simple desfosforilación acidifica el medio y altera de esta manera los resultados de la medida manométrica.

5. 2. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN AUSENCIA DE SUSTRATO.

El hígado es uno de los órganos que se caracterizan por su reducida producción de ácido láctico en aerobiosis. Los valores habituales de ácido láctico entregado fluctúan entre 1 y 2 μ l de CO₂

liberado del bicarbonato por mg de tejido seco y por hora, lo que corresponde aproximadamente a 1 - 2 μM de ácido láctico por 100 mg de tejido húmedo y por hora (Warburg, 1928; Dickens y Simmer, 1931; Dickens y Greville, 1933; Orr y Stickland, 1941; Burk, Behrens y Sugiura, 1941; Olson, 1951). En nuestros experimentos hemos encontrado valores medios del mismo orden, pero el margen de variación ha sido mayor: de 0,1 a 2,3 $\mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$ (Niemeyer, González y Figueroa, por publicar). Nos parece que esta mayor variación se debe a que hemos utilizado cortes de diferente contenido inicial de glicógeno y la cantidad de ácido láctico producida está en relación directa con el contenido de glicógeno en los cortes de hígado. En efecto, los datos de la Figura 16 muestran

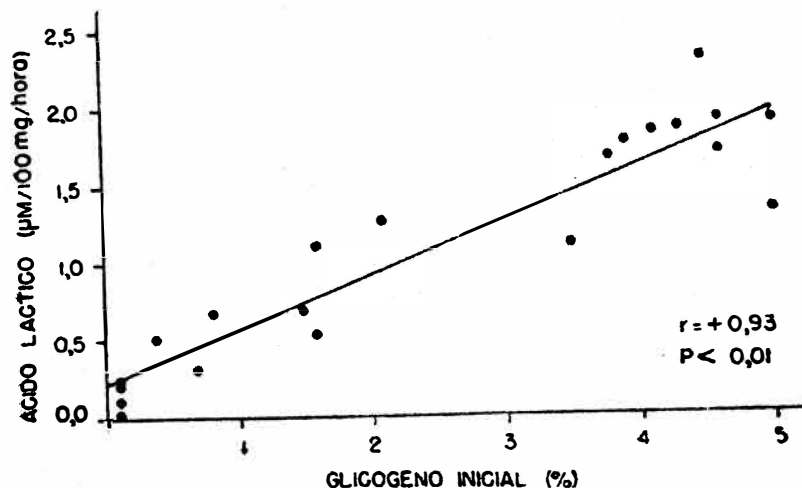


FIG. 16.—Influencia del contenido inicial de glicógeno sobre la cantidad de ácido láctico producido en cortes de hígado de rata, incubados en aerobiosis durante 60 minutos en solución de Krebs sin sustrato. (Datos de Niemeyer, González y Figueroa, por publicar).

que en los casos en que el contenido inicial de glicógeno es muy bajo, la producción de ácido láctico es muy pequeña, mientras que cuando el contenido de glicógeno es elevado (4 a 5%), el ácido láctico producido alcanza los valores más altos, o sea, de 1,5 a 2,3 $\mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$. El coeficiente de correlación entre el glicógeno inicial de los cortes y el ácido láctico producido es + 0,93 ($P < 0,01$).

A este respecto, conviene señalar que en los resultados publi-

cados por Craig (1943) y por Olson (1951) se observan diferencias en la cantidad de ácido láctico producido en aerobiosis por cortes de hígado provenientes de ratas en ayunas comparada con la de ratas bien alimentadas. Aun cuando Olson (1951) no considera importantes las diferencias, sus datos muestran que en los hígados con alto contenido de glicógeno (4,55%) el ácido láctico producido en ausencia de sustrato es casi cuatro veces superior al obtenido en cortes pobres en glicógeno (0,15%); 1,35 *versus* 0,35 μl de CO_2/mg de peso seco/hora, que equivalen aproximadamente a 1,5 y 0,4 $\mu\text{M}/100 \text{ mg}$ de peso húmedo/hora.

En anaerobiosis, esta dependencia entre la magnitud de la glicólisis y el contenido de glicógeno hepático había sido observada hace años (Rosenthal, 1929 y 1930; Orr y Stickland, 1941; Warren y Ebaugh, 1946).

En nuestra opinión, estos hechos tienen mucha importancia, pues indican que la velocidad de degradación del glicógeno en los cortes de hígado es función de su concentración en la célula y permiten interpretar algunos resultados obtenidos en diversas condiciones experimentales, como veremos más adelante.

5. 3. INFLUENCIA DE LA GLUCOSA.

La presencia de glucosa en el medio de incubación ocasiona un incremento del ácido láctico formado. En 32 experimentos en los que utilizamos glucosa en concentración de 30 mM/l, el exceso de ácido láctico producido, fué de $0,62 \pm 0,06 \mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$ (Tabla 10). La sobreproducción de ácido láctico ocasionada por la pre-

TABLA 10

Exceso de producción aeróbica de ácido láctico ocasionado por diversos sustratos, en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs (*).

Sustrato (30 mM/l)	N.º de exp.	Acido láctico (**) $\mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$
Glucosa	32	$0,62 \pm 0,06$
Glucosa-6-fosfato	19	$1,08 \pm 0,16$
Fructosa	8	$1,88 \pm 0,42$
Fructosa-di-fosfato	5	$3,22 \pm 0,32$

(*) Datos de Niemeyer, González y Figueroa, por publicar.

(**) Acido láctico producido por 100 mg de tejido fresco en presencia de sustrato, restado el que se produce en ausencia de sustrato en cortes del mismo hígado.

sencia del azúcar es sensiblemente igual en los cortes con un contenido de glicógeno bajo y alto. Estos resultados difieren de las observaciones de algunos investigadores, quienes han encontrado que los cambios de la glicólisis aerobia producidos por la glucosa no son significativos (Dickens y Greville, 1933; Elliot, Greig y Benoy, 1937; Orr y Stickland, 1941; Warren y Ebaugh, 1946; Olson, 1951). La disparidad de resultados puede ser la consecuencia de la baja concentración de azúcar empleada en los experimentos de los autores mencionados. En efecto, ellos han trabajado con concentraciones de glucosa de 0,2% (11 mM/l), y aún menores, siguiendo las indicaciones de Warburg (1928). En la Figura 17 aparecen los resultados

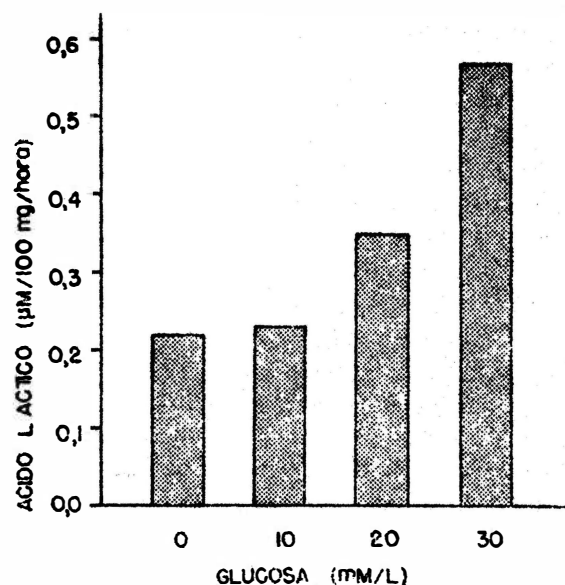


FIG. 17.—Influencia que ejerce la concentración de glucosa existente en el medio de incubación sobre el ácido láctico producido por cortes de hígado de rata. (Datos de Niemeyer, González y Figueroa, por publicar).

de un experimento típico, que muestra la relación existente entre la concentración de glucosa en el medio y la producción aerobia de ácido láctico y puede verse que la influencia de la glucosa se hace evidente sólo en concentración igual o mayor que 20 mM/l, lo que explica claramente la divergencia anotada.

5. 4. INFLUENCIA DE LA FRUCTOSA.

La fructosa añadida al medio de incubación ocasiona una sobreproducción de ácido láctico, en los cortes de hígado de rata, de magnitud muy superior a la que se observa cuando se agrega glucosa en iguales condiciones experimentales. En 8 experimentos esta sobreproducción alcanzó un promedio de $1,88 \pm 0,42 \mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$ (Tabla 10). Su magnitud no parece depender del contenido de glicógeno existente en el tejido ($r = -0,60$; $P > 0,1$).

La producción de ácido láctico es muy regular durante el período de incubación, como se ilustra en un experimento típico que aparece en la Figura 18.

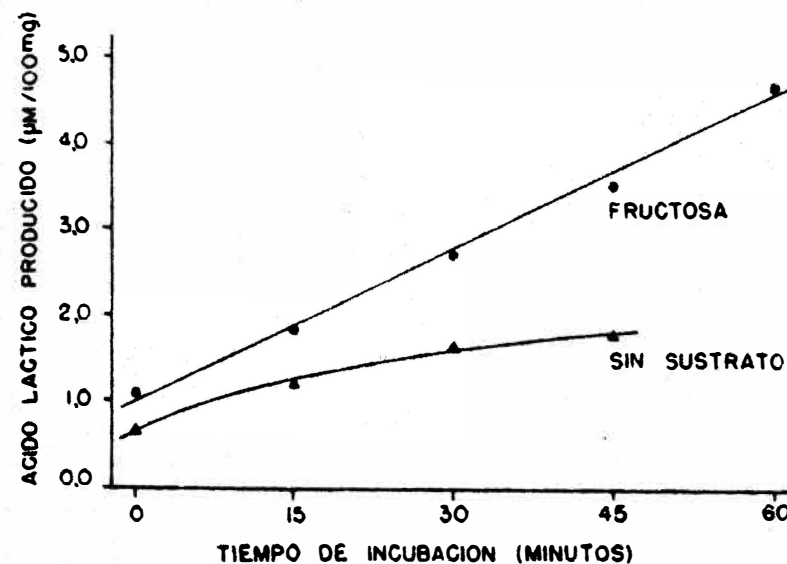


FIG. 18.—Producción de ácido láctico por cortes de hígado de rata incubados durante tiempos diversos. La fructosa se empleó en concentración de 30 mM/l. Cada punto corresponde al resultado de cortes diferentes provenientes del mismo hígado. (Datos de Niemeyer, González y Figueroa, por publicar).

No hemos encontrado ninguna referencia acerca del efecto de la fructosa en la producción aerobia de ácido láctico. En ausencia de oxígeno, en cambio, tal efecto ha sido motivo de algunos estudios. Así, Rosenthal (1929), trabajando con cortes de hígado de ratas sin ayuno previo, encontró que la fructosa al 0,2% (11 mM/l) triplica la glicólisis anaeróbica; en cambio, este incremento es escaso

en los hígados de animales en ayunas. Dickens y Greville (1932) confirmaron estos hallazgos en el hígado y encontraron que los otros tejidos de ratas sin ayuno previo se comportan de una manera diversa, a saber: en algunos (cerebro, retina, bazo, glándula submaxilar), la adición de fructosa no altera la producción de ácido láctico, y en otros (riñón, testículo), ella ocasiona sólo un leve aumento.

5. 5. INFLUENCIA DE LOS HEXOSAFOSFATOS.

La presencia de G-6-P en concentración de 30 mM/l, ocasiona en el medio donde se incuban cortes de hígado de rata, una sobreproducción de ácido láctico de magnitud superior a la observada con glucosa. En 19 experimentos, la media aritmética fué $1,08 \pm 0,16 \mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$ (Tabla 10). El estudio estadístico de los resultados obtenidos con glucosa y con G-6-P en cortes de un mismo hígado, reveló una diferencia media de $0,46 \pm 0,10$ ($P < 0,01$).

La agregación de F-di-P incrementa la producción aerobia de ácido láctico en una magnitud superior a la observada con fructosa. En efecto, en 5 experimentos, el promedio de esta sobreproducción fué de $3,22 \pm 0,32 \mu\text{M}/100 \text{ mg/hora}$ (Tabla 10), valor que difiere significativamente del observado con fructosa en cortes de los mismos hígados ($P < 0,05$).

No hemos encontrado datos acerca de la influencia que ejercen los hexosafosfatos en la producción aerobia de ácido láctico en cortes de hígado. En anaerobiosis, en cambio, el asunto ha sido motivo de algunas investigaciones. Así, Rosenthal (1930) encontró, en un experimento, que el F-di-P (11 mM/l) producía un incremento del 24,5% en la formación anaerobia de ácido láctico en cortes de hígado de rata, que el G-6-P en igual concentración ocasionaba un aumento del 10,5% y que el F-6-P no manifestaba efecto. Stoesz y LePage (1949) observaron que en homogenizados de hígado en anaerobiosis el F-di-P producía un incremento apreciable del ácido láctico. Olson, Robson, Richards y Hirsch (1950), trabajando también en anaerobiosis en homogenizados enriquecidos con ATP, encontraron que la sobreproducción de ácido láctico era muy superior con F-di-P que con los hexosamonofosfatos.

5. 6. INFLUENCIA DEL ÁCIDO PIRÚVICO.

La adición de ácido pirúvico al medio donde se incuban cortes de hígado de rata ocasiona la aparición de ácido láctico, el cual

puede medirse con confianza si se toman las precauciones recomendadas por Hullin y Noble (1953) para impedir la interferencia del ácido pirúvico en las determinaciones. En la Figura 19 se represen-

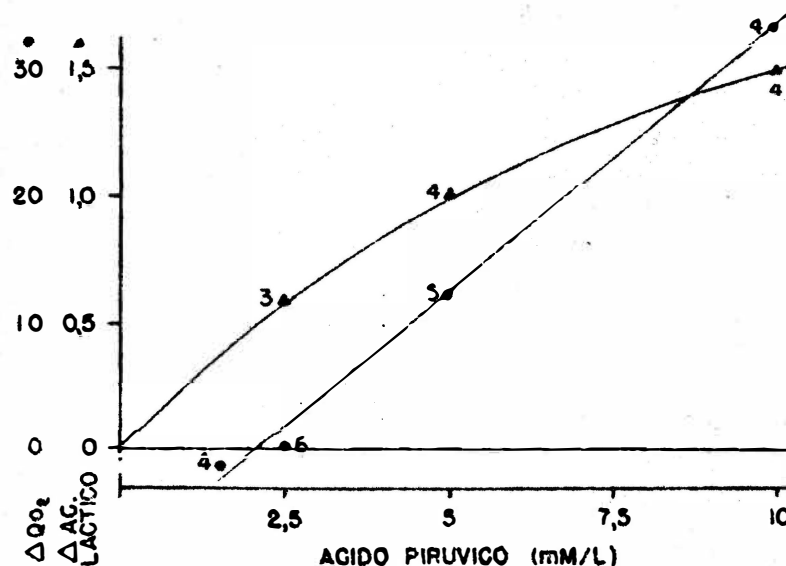


FIG. 19.—Influencia de la adición de ácido pirúvico al medio sobre la respiración y la producción aeróbica de ácido láctico en cortes de hígado de rata. ΔQO_2 = modificación del consumo de oxígeno, en tanto por ciento del testigo sin sustrato. $\Delta \text{ác. láctico}$ = exceso de ácido láctico producido, con respecto a los testigos sin sustrato, expresado en μM por 100 mg de tejido y por hora.

Las cifras representan el número de experimentos cuyo promedio corresponde al punto respectivo. (Datos de Niemeyer, González y Figueroa, por publicar).

tan los resultados obtenidos, empleando concentraciones variables de ácido pirúvico; cada punto de la gráfica representa el promedio de varios experimentos. En esta figura también se indica la modificación del consumo de oxígeno ocasionada por la adición del sustrato. Estos experimentos muestran que el piruvato en concentraciones inferiores a 2,5 mM/l, no produce una modificación medible en el consumo de oxígeno, en cambio ocasiona una sobreproducción apreciable de ácido láctico. Estos datos permiten hacer una interpretación de los resultados obtenidos con glucosa tanto en la respiración del tejido como en la producción de ácido láctico, como se discutirá más adelante (§ 5. 8. 1).

5. 7. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EN EL LÍQUIDO DONDE SE HAN INCUBADO CORTES DE HÍGADO.

Algunos estudios referentes al metabolismo de los hidratos de carbono realizados en trozos de diafragma de rata suspendidos en medio salino, han demostrado que diversas enzimas del músculo se difunden hacia el medio de incubación. En efecto, se ha podido comprobar que la solución donde se han incubado estos trozos de diafragma es capaz de convertir G-6-P en F-6-P y viceversa, y G-1-P en F-6-P, después que el tejido se ha retirado (Beloff-Chain, Chain, Bovet, Pocchiari, Catanzaro y Longinotti, 1953). Independientemente, otros autores demostraron que este líquido no sólo es capaz de convertir G-1-P en otros hexosafosfatos, sino que también tiene la propiedad de convertir el G-1-P y el F-di-P en ácido láctico a una velocidad que explica completamente la glicólisis que ocurre en presencia del tejido (Zierler, Levy y Andres, 1953). Es importante señalar que el líquido libre de tejido no es capaz de transformar la glucosa en hexosafosfatos.

Estos antecedentes nos indujeron a investigar lo que ocurre en el líquido en que se han incubado cortes de hígado de rata. Con este objeto utilizamos la solución salina en la cual se habían incubado cortes de hígado en la proporción de 100 mg por cada 2 ml de líquido, durante una hora a 37°C en ambiente oxigenado. A la solución libre del tejido agregamos diversos sustratos en concentración de 20 ó 30 mM/l. El análisis del medio después de una hora de incubación demostró que en dos experimentos en que se utilizó F-di-P como sustrato la cantidad de ácido láctico producido fue de 2,1 y 2,3 μ M/l respectivamente. En cambio no se produjo ácido láctico cuando el medio contenía fructosa; si el sustrato añadido es el G-6-P, prácticamente no se produce ácido láctico, pero hay formación de fructosafosfatos, aunque en pequeña proporción.

Tal como en los experimentos de Zierler, Levy y Andres (1953), el líquido donde se han incubado cortes de hígado no muestra consumo de oxígeno aún cuando contenga sustratos.

Estos experimentos demuestran que los fermentos responsables de la glicólisis del F-di-P se difunden con facilidad al medio donde se incuban cortes de hígado de rata. Asimismo, demuestran que en este líquido no se encuentran los sistemas enzimáticos responsables de la fosforilación inicial de la fructosa ni de la fosforilación de los hexosamonofosfatos para convertirlos en F-di-P, como tampoco los responsables de la oxidación de los diversos sustratos en-

sayados. En el capítulo 7 comentaremos el hecho de que no existe actividad glucosa-6-fosfatásica en este medio.

5. 8. DISCUSIÓN.

5. 8. 1. Llama la atención el hecho de que la presencia de glucosa, a pesar de no modificar el consumo de oxígeno, aumenta la producción de ácido láctico. Es posible que la falta de incremento del consumo de oxígeno se deba a que la glucosa reemplaza en cierta proporción a los metabolitos endógenos no glucídicos que la célula hepática utiliza cuando no se añaden sustratos al medio de incubación. Esta posibilidad ha quedado suficientemente demostrada a través de diversos estudios en los cuales se ha empleado glucosa marcada con isótopos. Así, agregando glucosa-C¹⁴ en el medio en que se incuban cortes de hígado se ha observado aparición de C¹⁴O₂, sin que se modifique en forma significativa el consumo de oxígeno (§ 4. 2. 6).

Un efecto semejante al que produce la adición de glucosa se consigue con piruvato, cuando éste se agrega al medio de incubación en concentración doce veces menor (2,5 mM/l). Así se ha observado (§ 5. 6) que, si bien la respiración de los cortes de hígado no se modifica apreciablemente por la presencia de piruvato en esa concentración, la producción de ácido láctico aumenta en cantidad comparable a la que aparece en presencia de glucosa en concentración de 30 mM/l. Todo sucede, pues, como si la degradación de la glucosa lograra dentro de la célula una concentración de piruvato similar a la que se obtiene con un reducido aporte exógeno de este metabolito.

Por otra parte, la utilización del piruvato marcado con C¹⁴ ha permitido conocer la magnitud relativa de su transformación en ácido láctico y de su oxidación hasta convertirse en anhídrido carbónico y agua. En efecto, Hastings, Teng, Nesbitt y Sinex (1952) comprobaron que en cortes de hígado la cantidad de lactato marcado producida es aproximadamente el doble que la cantidad de piruvato oxidado, utilizando como medida de este último la entrega de C¹⁴O₂. Los experimentos de Olson (1951), realizados también en cortes de hígado de rata en otro medio de incubación, muestran que la producción de ácido láctico y la de anhídrido carbónico provenientes del piruvato marcado son aproximadamente iguales.

5. 8. 2. Corroborando los resultados obtenidos en el estudio del consumo de oxígeno, la medición del ácido láctico producido por

cortes de hígado señala que el G-6-P se degrada más fácilmente que la glucosa. Así, la presencia de G-6-P en el medio de incubación ocasiona una sobreproducción de ácido láctico superior a la que se observa con glucosa. Este hecho señala de nuevo que en el hígado existe una cierta limitación en la conversión de glucosa en G-6-P, limitación que permite explicar la reducida capacidad de la célula hepática para degradar la glucosa.

Si se compara la sobreproducción de ácido láctico ocasionada en cortes de hígado de rata por la presencia de G-6-P y de F-di-P, se observa que es muy superior en el último caso (§ 5. 5.). Esta diferencia había sido ya observada por Olson, Robson, Richards y Hirsch (1950) en homogenizados de hígado de rata incubados en anaerobiosis en un medio enriquecido con ATP.

Debe aceptarse, por lo tanto, que existe en el hígado una limitación en la conversión de hexosamonofosfato en F-di-P, limitación que se expresa también en el consumo de oxígeno (§ 4. 4. 1) y que podría explicarse por el hecho de que el hígado posee una actividad fosfohexoquinásica muy inferior a la de otros tejidos, como se mostró en el párrafo 4. 6.

También es posible que la vía fundamental de utilización de los hexosafosfatos sea diferente, y que mientras los hexasomonofosfatos se degradan preferentemente siguiendo la vía oxidativa de Warburg-Dickens-Lipmann, el F-di-P siga de preferencia la vía glicolítica de Embden-Meyerhof. Si ocurre que en el hígado una parte importante de la glucosa se oxida a través de la vía oxidativa —como parecen indicarlo los experimentos de Stetten y colaboradores (§ 3. 7)— se podría afirmar que lo mismo ocurriría con el G-6-P, pues este metabolito intermedio constituye una etapa obligada en la degradación de la glucosa por ambas vías. No sería raro que el F-6-P siguiera el mismo camino después de convertirse en G-6-P, puesto que esta transformación parece ser fácil en el hígado (§ 7. 3). En cambio, en este órgano la conversión de F-di-P en F-6-P catalizada por la fructosadifosfatasa, parece ser reducida (§ 7. 3). El hecho de que la producción de ácido láctico a partir de F-di-P sea mayor que la observada en presencia de los hexosamonofosfatos hace pensar, por otra parte, que el F-di-P sigue preferentemente el camino de la degradación a triosas (§ 5. 5).

No obstante, hay que tener presente que el ácido láctico aparecido corresponde a la suma del producido por los cortes de hígado

más el formado en el líquido de incubación; este último sólo constituye una fracción importante cuando el sustrato es F-di-P.

5. 8. 3. Los resultados que se refieren a la producción de ácido láctico a expensas de la fructosa, muestran que ella es superior a la que se observa en presencia de glucosa o de G-6-P. Como veremos más adelante, la fructosa es mejor precursora del glicógeno que la glucosa y que diversos hexosafosfatos, lo cual hace pensar que la glicogénesis a expensas de fructosa no se haga a través de su conversión en glucosa libre o en glucosa-fosfatos (§ 6. 7). Podría ocurrir entonces que la fructosa disponga de dos vías metabólicas diferentes para su aprovechamiento en el tejido hepático a saber: la formación de glicógeno y la transformación en triosas después de haberse convertido en F-1-P (§ 3. 4). La posibilidad de que la utilización de la fructosa se efectúe por dos vías diferentes, recibe un apoyo en la interesante observación de Renold, Hastings y Nesbitt (1954), quienes han mostrado que en cortes de hígado de ratas con diabetes aloxánica se encuentra inhibida la formación de glicógeno a partir de fructosa, pero no la degradación de este azúcar hacia anhídrido carbónico. La existencia de estas dos vías no excluye la posibilidad de la formación de glicógeno a partir de las triosas resultantes de la degradación de la fructosa, demostrada por Hers (1955) en el animal entero (§ 3. 4. 1).

RELACIONES DE LAS HEXOSAS Y LOS HEXOSAFOSFATOS CON EL GLICOGENO HEPATICO

6. 1. Es un hecho ya establecido el que las modificaciones del contenido iónico del medio de incubación ejercen influencia sobre el metabolismo glucídico de cortes de tejidos. Por consiguiente, el estudio de las relaciones de las hexosas y algunos de sus ésteres fosfóricos con el glicógeno de cortes de hígado, requiere la utilización de soluciones salinas de diferente composición. Para comprender la influencia de las variaciones iónicas del medio, es necesario examinar previamente los efectos que ellas producen sobre el contenido iónico intracelular.

6. 2. ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO IÓNICO EN CORTES DE TEJIDOS.

Diversos investigadores han demostrado que durante la incubación de los cortes de hígado en soluciones salinas de composición semejante a la de los líquidos extracelulares, el potasio intracelular se difunde hacia el medio, dando lugar a un empobrecimiento de la célula en este catión. En efecto, Steinbach (1940) en el músculo sartorio de la rana, y Boyle y Conway (1941) en el mismo músculo y además en cortes de hígado y de riñón de rana, han observado esta migración del potasio celular al medio. Estos últimos autores han demostrado que para que el contenido celular de potasio se mantenga, es necesario que la concentración de este ión en el medio sea de 20 a 22 mE/l. Posteriormente se ha examinado este problema con mayor detalle, estudiándose las condiciones más adecuadas para evitar o disminuir el escape del potasio de las células. Así, Flink, Hastings y Lowry (1950) suspendieron cortes de hígado de rata en medios salinos con diverso contenido de potasio, y encontraron

que cuando las concentraciones de potasio era de 5 mE/l, la concentración de este ión descendía en la célula y aumentaba en el líquido de incubación. El descenso era más acentuado en los primeros 15 minutos y el nivel de potasio celular se recuperaba hasta un 80% del inicial alrededor de los 45 minutos. Cuando el potasio del medio era 34 mE/l, se observaba un descenso inicial de menor grado y la recuperación era total entre los 45 y 60 minutos. Aumentando la concentración de potasio hasta reemplazar totalmente el sodio, se conseguía sobrepasar el contenido normal de las células del hígado —que es de $31,8 \pm 1,6$ mE/l por 100 g de sólidos libres de grasa— llegándose alrededor de los 30 minutos de incubación hasta 80 mE/l por 100 g de sólidos libres de grasa. En anaerobiosis, el escape del potasio era más intenso, siendo este fenómeno reversible sólo cuando la privación de oxígeno no se prolongaba más de 5 a 10 minutos. El fluoruro de sodio favorecía igualmente la salida del potasio.

En cortes de cerebro suspendidos en solución salina, se ha observado también una pérdida paulatina del potasio celular. Dixon (1949) encontró que esta pérdida se podía prevenir aún en anaerobiosis, agregando glucosa al medio de incubación. Krebs y Eggleston (1949) no han confirmado este hallazgo, pues encontraron que el escape de potasio no podía evitarse por la presencia de glucosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. El glutamato, en cambio, conseguía evitarla.

Posteriormente Krebs, Eggleston y Turner (1951), hicieron un estudio más prolijo del intercambio de potasio entre las células y el medio extracelular, en diversos tejidos. Encontraron así que en el cerebro de cobayo y en la retina de vacuno, el escape de potasio ocurre principalmente en los primeros minutos de la incubación, luego se recupera en parte, y entre los 45 y 65 minutos la concentración se mantiene estable. En este momento midieron la velocidad del intercambio, con potasio marcado (isótopo K^{42}), y comprobaron que en cortes de cerebro varía entre un 2,5 y un 4% del potasio total en un minuto, y en la retina, entre un 7 y un 10%. En estos mismos experimentos los autores confirmaron que la presencia de glutamato en el medio de incitación produce una inhibición acentuada de la salida del potasio. En cortes de riñón suspendidos en solución de Ringer, la pérdida de potasio celular en ambiente de oxígeno es alrededor de un 30% y en anaerobiosis, alrededor de un 70%. La adición de glutamato, L-aspartato y especialmente α -quetoglutarato (10 mM/l) ocasiona una disminución notable del

escape de potasio, mientras que la presencia de otros sustratos, como glucosa, succinato, citrato y fumarato, no alteran el fenómeno. En cortes de hígado de cobayo, la pérdida de potasio es de un 40 a un 60% (70% en anaerobiosis), y no es prevenida por la adición de glucosa, piruvato, succinato, fumarato, citrato, α -quetoglutarato, oxalacetato, glucosa más glutamato, o ATP solo o en combinación con varios sustratos. Tampoco el aumento de la concentración de potasio en el medio hasta 25 mE/l evita el escape. Los cortes de páncreas de paloma pierden de un 20 a un 30% de su potasio, aún en presencia de diversos sustratos. Como ejemplo de músculo liso, los autores emplearon la capa muscular de la molleja de paloma, en donde la pérdida de potasio fué del 50 al 80%, y la adición de diversos sustratos fué ineficaz para evitarla. Con respecto al músculo estriado, es interesante señalar que otros autores han demostrado que el diafragma de rata no entrega potasio al medio de incubación (Kaminga, Willebrands, Groen y Blickman, 1950).

Krebs, Eggleston y Turner (1951) consideran que la rápida pérdida de potasio de los tejidos constituye una manifestación de daño celular, y la comparan con la que se observa *in vivo* en el hígado y en otros tejidos, en casos de asfixia, choque e intervenciones quirúrgicas. En estas condiciones, la célula no sería capaz de efectuar el trabajo osmótico necesario para mantener el gradiente de concentración que existe entre el interior de la célula y su medio circundante. Estos autores calculan que en el caso de la corteza cerebral el trabajo osmótico sería del orden de 365 cal/hora/kg, lo que representa aproximadamente un 2,5% de la energía proporcionada por la respiración.

Aebi (1952 y 1953) ha estudiado diversas condiciones que modifican el contenido de electrolitos y de agua en varios tejidos de rata, cobayo y conejo, y ha observado que la salida de potasio que se produce durante la incubación de los cortes, es inhibida cuando se aumenta la concentración de potasio en la solución salina. Por ejemplo, en el hígado de cobayo, con 40 mE/l de potasio se consigue mantener el contenido de potasio del tejido en el mismo nivel que tiene *in vivo*. La ausencia de calcio, el frío y la anaerobiosis acentúan la pérdida de potasio (Aebi, 1952).

Durante la incubación de cortes de hígado, el contenido celular de sodio experimenta un aumento mayor que la disminución del potasio, de modo que la suma de sodio más potasio en la célula es alrededor de un 30% superior a la que se encuentra en el tejido

recién obtenido del animal. En otros tejidos ocurre fenómeno análogo (Aebi, 1953).

6. 3. EVOLUCIÓN DEL GLICÓGENO EN CORTES DE HÍGADO INCUBADOS EN MEDIOS SIN SUSTRATO.

6. 3. 1. Cuando se incuban cortes de hígado en medios salinos que no contienen sustrato, se observa regularmente una desaparición paulatina del glicógeno. La velocidad de esta desaparición no es constante, sino que va disminuyendo gradualmente en el curso de la incubación, lo que puede apreciarse en algunos experimentos representados en la Figura 20. En el gráfico A de esta figura, las orde-

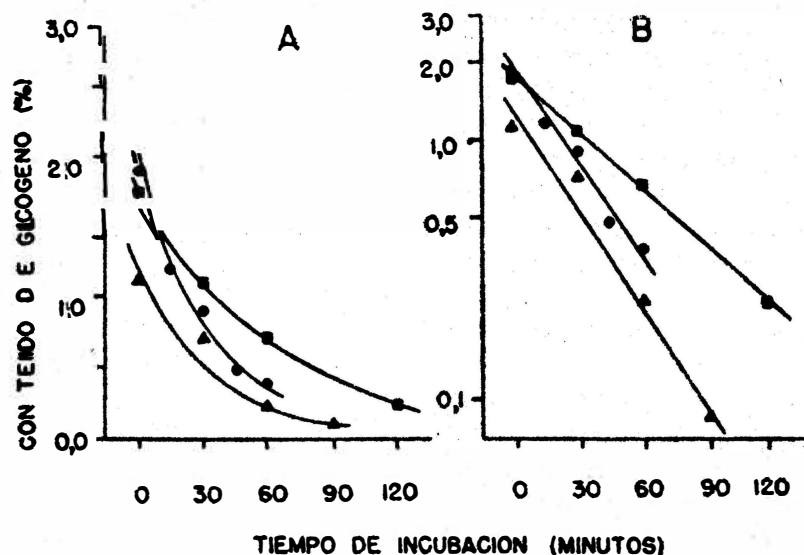


FIG. 20.—Evolución espontánea del glicógeno en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs. En A el glicógeno está expresado en escala aritmética y en B, en escala logarítmica. Cada signo representa un experimento distinto. (Datos de Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953).

nadas representan el contenido de glicógeno y las abscisas, el tiempo de incubación; en el gráfico B, las ordenadas corresponden a los logaritmos de la concentración de glicógeno. En este último caso, la línea de regresión, que representa la desaparición del glicógeno durante la incubación, es recta, lo cual indica que el fenómeno sigue la ley de las reacciones de primer orden. Según esta ley, en la unidad de tiempo desaparece una fracción constante del glicógeno pre-

sente, y de este modo, la fracción desaparecida en un tiempo dado, puede calcularse de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Fracción de glicógeno desaparecido} = \frac{2,3 (\log G_i - \log G_f)}{t_f - t_i}$$

donde G_i y G_f corresponden a las concentraciones inicial y final de glicógeno, y t_i y t_f , a los tiempos respectivos.

Esta ley explica por qué la cantidad de glicógeno desaparecido en un determinado tiempo de incubación varía de un experimento a otro, de acuerdo con la concentración inicial de glicógeno. De ahí resulta también que si se determina el glicógeno residual después de un tiempo de incubación definido (60 minutos), la relación

$$\frac{G_f}{G_i} \times 100$$

es independiente del contenido inicial de glicógeno, y es característica de la desaparición en cada condición experimental. Evidentemente, este valor resulta afectado por las fluctuaciones individuales propias de los seres vivos. Este aserto aparece claramente confirmado en los resultados experimentales resumidos en la Tabla 14 (§ 6. 3. 3).

6. 3. 2. *Entrega de glucosa al medio.*—La mayor parte del glicógeno que desaparece se recupera en el medio de incubación, en forma de glucosa, lo que indica que la glicogenólisis es el destino principal del glicógeno. En nuestros experimentos que aparecen resumidos en la Figura 21, la glucosa recuperada representa aproximadamente el 80% del glicógeno desaparecido. Sin embargo, cuando el contenido inicial de glicógeno es muy bajo (menos del 1%), la glucosa entregada por el tejido es proporcionalmente mayor, e incluso llega frecuentemente a sobrepasar la cantidad que corresponde al glicógeno desaparecido. Esto indica que en las condiciones experimentales señaladas, se produce glucosa a expensas de otras sustancias (gliconeogénesis). Los hechos expuestos están en concordancia con los datos de otros investigadores, quienes han encontrado un aumento de los hidratos de carbono totales durante la incubación de cortes de hígado obtenidos de animales en ayunas (Stadie, Luckens y Za pp, 1940). Esto no significa que en los cortes de hígado con alto contenido en glicógeno no exista gliconeogénesis; pero en estos ca-

los el fenómeno sólo podría ponerse en evidencia mediante el empleo de moléculas marcadas.

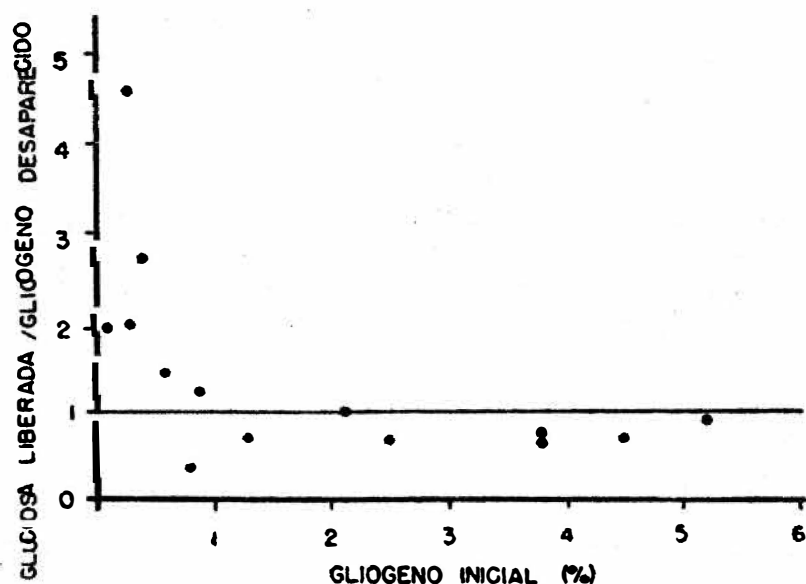


FIG. 21.—Influencia del glicógeno inicial sobre la relación existente entre la glucosa liberada y el glicógeno desaparecido, en cortes de hígado de rata incubados durante 60 minutos en solución de Krebs. (Datos de Niemeyer y Figueroa, no publicados).

6. 3. 3. *Influencia de la composición catiónica del medio sobre el glicógeno hepático.*—Las informaciones proporcionadas en el § 6. 2. muestran que en las condiciones habituales de trabajo con cortes aislados de tejido, se producen cambios en la composición catiónica de las células, los que deben tenerse presente en la interpretación de los resultados. Se comprende fácilmente, por lo tanto, que la respuesta metabólica del hígado pueda ser diversa según la composición iónica del medio.

De un modo general, el reemplazo del Na^+ por K^+ inhibe la destrucción del glicógeno, a la vez que favorece su formación a expensas de la glucosa y de otros sustratos (Hastings y Buchanan, 1942; Buchanan, Hastings y Nesbitt, 1949 *a* y *b*; Hastings, Teng, Nesbitt y Sinex, 1952). El aumento de la concentración de Ca^{++} o de Mg^{++} acentúa el efecto del K^+ .

Las modificaciones de la composición catiónica del medio alte-

ran también la glicólisis anaeróbica de cortes de hígado; así, ésta aumenta cuando el medio se enriquece en K^+ (Warren y Ebaugh, 1946). No se sabe aún si los efectos de la diferente composición iónica son la consecuencia de modificaciones generales e inespecíficas de las células, o si se trata de acciones sobre sistemas enzimáticos determinados, especialmente sensibles a la proporción relativa de iones. Desde luego, son muchas las enzimas del metabolismo intermedio de los hidratos de carbono que actuando aisladamente requieren K^+ o Mg^{++} para expresar su máxima actividad. En el capítulo 7 presentaremos algunos experimentos que indican la posibilidad de que al menos una enzima presente en los cortes de hígado, la glucosa-6-fosfatasa, puede ser inhibida por la presencia de K^+ en concentraciones elevadas.

Dada la enorme importancia que la composición catiónica ejerce sobre el metabolismo glucídico, nos pareció necesario estudiar el comportamiento del glicógeno en cortes de hígado, utilizando soluciones salinas con diferente proporción relativa de iones. En estos experimentos hemos empleado tanto el medio clásico de Krebs (1933) con amortiguador de fosfato, que se asemeja en su composición salina a los líquidos extracelulares, como también el medio de Hastings, Teng, Nesbitt y Sinex (1952) con amortiguador de bicarbonato, que no tiene Na^+ y que es rico en K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . En algunos experimentos hemos ensayado, además, diversas modificaciones en la composición salina del medio, y hemos obtenido así una solución que denominamos KH, que utiliza un amortiguador de fosfato, como el medio de Krebs, y que no contiene Na^+ y es rica en K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , como la solución de Hastings. La composición de las soluciones mencionadas se indica en la Tabla 11.

La influencia que ejerce el contenido de potasio del medio en la desaparición del glicógeno de los cortes de hígado, se puede apreciar en los datos de la Tabla 12. En ella se observa que el cambio del Na^+ por K^+ , manteniendo constante la concentración de los otros iones, inhibe la desaparición del glicógeno en los cortes, tanto en ausencia de sustrato, como en presencia de glucosa.

En la Tabla 13, se compara la velocidad de desaparición del glicógeno, en las tres soluciones salinas mencionadas. De sus datos se deduce que durante la incubación en solución de Krebs sin agregación de sustrato, el promedio de glicógeno residual después de 60 minutos es $23 \pm 2,2 \%$ del inicial, mientras que en solución de Hastings es $74 \pm 4,6 \%$, y en solución KH tiene un valor intermedio,

de $57 \pm 4,6 \%$. En presencia de glucosa ocurre algo parecido, como analizaremos en el párrafo siguiente.

TABLA 11

Composición de las diferentes soluciones salinas empleadas como medio de incubación (*).

Solución madre		Krebs ml	KH ml	Hastings ml
NaCl	0,154 M	102	—	—
KCl	0,154 M	4	70	47
CaCl ₂	0,11 M	1	4	9
MgCl ₂	0,11 M	—	18	18
MgSO ₄	0,154 M	1	—	—
Na ₂ HPO ₄	0,10 M (**)	21	—	—
K ₂ HPO ₄	0,10 M (**)	—	8	—
KHCO ₃	0,154 M	—	—	26

(*) Las soluciones de Krebs y KH se equilibran con 100% O₂ y la de Hastings con 95% O₂ y 5% CO₂.

(**) pH 7,4.

TABLA 12

Influencia de la concentración de Na⁺ y de K⁺ del medio sobre la desaparición del glicógeno en cortes de hígado (*).

Exp. N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno residual (% del inicial) (**)					
		Sin sustrato			Con glucosa (30 mM/l)		
		Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺	K ⁺	Na ⁺	Na ⁺ -K ⁺	K ⁺
1	0,04	25	—	75	—	—	—
2	4,25	19	27	54	22	38	70
3	5,66	38	45	54	47	51	61

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa, no publicados.

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial de los cortes, que resta después de una hora de incubación.
Na⁺ indica que la solución sólo tenía sodio (120 mE/l) y no potasio; K⁺ que tenía potasio (120 mE/l) en vez de sodio, y Na⁺-K⁺ que tenía la mitad de cada uno de estos iones (60 mE/l).

TABLA 13

Evolución del glicógeno en cortes de hígado de rata incubados en diferentes medios, sin sustrato y con glucosa (30 mM/l) (*).

Glicógeno inicial %	Glicógeno residual					
	Krebs		K H		Hastings	
	N.º de exp.	% (**)	N.º de exp.	% (**)	N.º de exp.	% (**)
Sin sustrato						
0,01 - 1,00	19	18 ± 3,0	5	47 ± 13,5	9	78 ± 7,5
1,01 - 2,00	12	17 ± 3,6	5	54 ± 2,5	4	68 ± 7,7
2,01 - 3,00	10	27 ± 6,6	8	63 ± 3,1	2	68 ± 3,6
3,01 o más	13	31 ± 4,4	4	59 ± 4,9	1	76
Total	54	23 ± 2,2	22	57 ± 4,6	16	74 ± 4,6
Glucosa (30 mM/l)						
0,01 - 1,00	21	34 ± 4,8	3	148 ± 46,5	15	200 ± 30,5
1,00 - 2,00	10	34 ± 7,0	3	74 ± 9,4	4	92 ± 3,7
2,01 - 3,00	9	47 ± 10,0	7	84 ± 5,1	3	99 ± 7,8
3,01 o más	14	47 ± 5,4	3	70 ± 3,8	2	148 ± 64,5
Total	54	40 ± 3,2	16	92 ± 10,6	24	165 ± 21,6

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa (1953), de Cruz Coke, Niemeyer y Figueroa (1954) y de Niemeyer y Figueroa (1955 a y b).

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial presente a los 60 minutos de incubación; media aritmética ± su error típico.

6. 3. 4. Influencia de la concentración de fosfato inorgánico en el medio sobre el glicógeno hepático.—Además de la concentración relativa de cationes en la solución salina, algunos datos parecen indicar que la concentración de fosfato inorgánico pudiera influir en los procesos de glicogénesis. En efecto, Ostern, Herbert y Holmes (1939) observaron que la síntesis neta de glicógeno que ocurre en

cortes de hígado de conejo suspendidos en medio salino con amortiguador de bicarbonato, disminuía cuando se añadía fosfato inorgánico. Sin embargo, Buchanan, Hastings y Nesbett (1949 a) no observaron influencia del fosfato inorgánico, ni aún en concentración de 40 mM/l, sobre la formación de glicógeno en cortes de hígado de rata incubados en un medio rico en K^+ y en Mg^{++} .

En vista del interés que tiene el problema, especialmente cuando se trata de comparar el efecto que ejercen sobre el contenido de glicógeno, las hexosas y sus ésteres fosfóricos, los cuales liberan fosfato inorgánico al medio, hicimos algunos experimentos para conocer la influencia que en este sentido podría tener la concentración de fosfato inorgánico, en nuestras condiciones experimentales. En la Tabla 14 se puede apreciar que variando la concentración de fosfato desde 8 hasta 24 mM/l no se modifica significativamente el glicógeno final de los cortes, ya sea en ausencia de sustrato, ya sea

TABLA 14

Influencia de la concentración de fosfato inorgánico del medio sobre la evolución de glicógeno en cortes de hígado de rata ().*

Exp. N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno final (%) (**)					
		Sin sustrato			Con glucosa (30 mM/l)		
		8	16	24	8	16	24
1	0,42	—	0,07	0,07	—	0,08	0,08
2	—	0,75	—	0,75	1,25	1,20	1,45
3	—	0,81	0,96	0,86	1,76	1,46	1,56
4	3,10	—	1,24	1,19	—	1,69	1,59
5	4,49	—	1,31	1,22	—	1,84	1,87
6	7,50	—	3,54	3,62	—	5,19	5,15

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa (1955 b).

(**) Contenido de glicógeno después de una hora de incubación. Las cifras que encabezan las columnas corresponden a concentración de fosfato inorgánico del medio (mM/l).

en presencia de glucosa. La concentración del medio de Krebs es 16 mM/l (Tabla 11; § 6. 3. 3).

6. 4. INFLUENCIA DE LA GLUCOSA.

6. 4. 1. Si se coloca glucosa en el medio en que se incuban los cortes de hígado, el contenido de glicógeno que resta después de la incubación es siempre mayor que en los testigos sin sustrato, como puede apreciarse en los datos de la Tabla 13 (§ 6. 3. 3).

En presencia de glucosa, la desaparición del glicógeno sigue también la ley de las reacciones de primer orden (§ 6. 3. 1.). La velocidad de desaparición, medida por la fracción del glicógeno preexistente que desaparece en un tiempo dado, es menor que la de los testigos incubados en ausencia de sustrato y es independiente de la concentración inicial de glicógeno. De este modo, el efecto de la glucosa sobre el glicógeno hepático, expresado en tanto por ciento del glicógeno inicial, será:

$$\text{Efecto de la glucosa} = 100 (G_f - G_i) / G_i$$

donde G_f y G_i representan el glicógeno final con glucosa y sin sustrato respectivamente, y G_i , el glicógeno inicial que es común para ambas condiciones experimentales.

Los experimentos muestran que el efecto de la glucosa, así expresado, es independiente del contenido de glicógeno, dentro de los márgenes de fluctuación de los experimentos biológicos. Si el efecto de la glucosa se mide por la diferencia absoluta del glicógeno final entre los cortes incubados con glucosa y los testigos sin sustrato, se comprende que aparezca directamente proporcional al contenido de glicógeno.

6. 4. 2. La inhibición de la glicogenólisis ocasionada por la glucosa depende de su concentración en el medio, fenómeno que se ilustra con los datos de un experimento típico en la Figura 22. Llama la atención que aún en la elevada concentración de 60 mM/l, no se consigue síntesis neta de glicógeno en cortes de hígado de rata. Este hecho ha sido observado también por diversos investigadores, quienes han realizado experimentos similares a los nuestros, con otros propósitos (Bendall y Lehmann, 1942; Buchanan, Hastings y Nesbett, 1949 a; Chiu y Needham, 1950). Sin embargo, Bendall y Lehmann (1942) han comunicado el hecho curioso y no explicado,

que si la rata es mantenida en la oscuridad durante algunas semanas antes de ser sacrificada, se puede obtener síntesis neta de glicógeno en medios con glucosa en concentración de 56 mM/l (1%).

Contrariamente a lo que ocurre en el hígado de rata, en cortes de hígado de conejo incubados en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (56 mM/l), el glicógeno final suele ser superior al inicial, lo que acusa la producción de síntesis neta de glicógeno (Cross y Holmes, 1937; Holmes y Lehmann, 1940; Bendall y Lehmann, 1941).

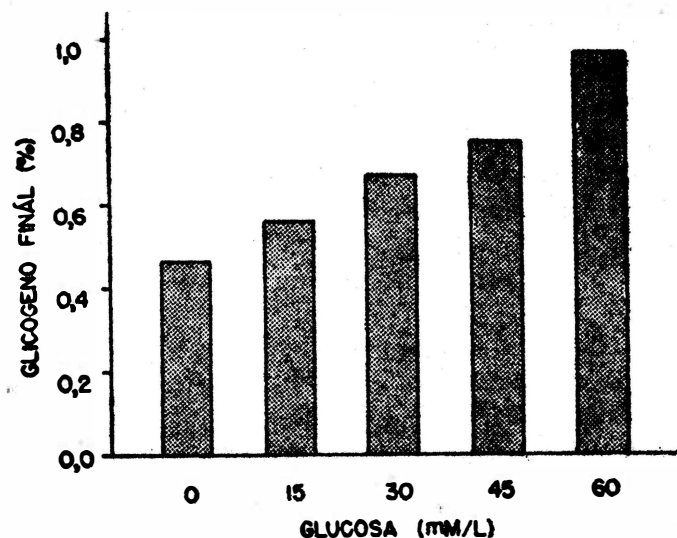


FIG. 22.—Influencia de la concentración de glucosa en el medio sobre el contenido de glicógeno de cortes de hígado incubados en solución de Krebs durante 60 minutos. (Datos de Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953).

6. 4. 3. Alterando la proporción relativa de cationes de la solución salina, de modo que aumente la concentración de K^+ , Hastings y colaboradores lograron producir síntesis neta de glicógeno en cortes de hígado de rata, utilizando concentraciones también muy altas de glucosa (56 mM/l) (Hastings y Buchanan, 1942; Deane, Nesbitt, Buchanan y Hastings, 1947; Buchanan, Hastings y Nesbitt, 1949 a). Posteriormente, Hastings, Teng, Nesbitt y Sinex (1952) consiguieron producir síntesis neta de glicógeno en cortes de hígado de rata, con glucosa en concentraciones de 20 a 30 mM/l, utilizando un me-

dio de incubación perfeccionado, rico en K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . Por este motivo, si se desea estudiar la síntesis neta de glicógeno en cortes de hígado de rata, debe recurrirse a este medio de incubación.

En la Tabla 13 (§ 6. 3. 3) se resumen los resultados obtenidos en nuestros experimentos en que hemos utilizado diversos medios de incubación. Puede verse en ella que el glicógeno residual en presencia de glucosa es de $40 \pm 3,2\%$ en solución de Krebs, de $92 \pm 10,6\%$ en el medio KH y de $165 \pm 21,6\%$ en solución de Hastings, valores que difieren significativamente entre sí.

En solución de Hastings sólo se obtiene síntesis neta de glicógeno de un modo constante cuando el contenido inicial de glicógeno en los cortes es inferior al 1% (Cruz Coke, Niemeyer y Figueroa, 1954), fenómeno que ya había sido señalado por Hastings, Teng, Nesbitt y Sinex (1952). Cuando el contenido inicial de glicógeno es mayor, no siempre se observa síntesis neta de glicógeno, pero en todo caso la desaparición del glicógeno se inhibe casi totalmente, y cuando hay síntesis neta, ella es de magnitud mayor, expresada en términos absolutos, que la que se observa en los cortes con bajo contenido inicial de glicógeno (Renold, Teng, Nesbitt y Hastings, 1953; Cruz Coke, Niemeyer y Figueroa, 1954). Utilizando la solución KH, sólo excepcionalmente hemos observado síntesis neta de glicógeno; pero la glicogenólisis es menor que la de los testigos en solución de Krebs.

Para los fines de la interpretación de las relaciones metabólicas entre glucosa y glicógeno, es importante destacar que cuando se emplea glucosa marcada se observa la incorporación de los carbonos isótopos en el glicógeno, aunque se trabaje en condiciones en las cuales no se produce síntesis neta de glicógeno (Hill, Baker y Chaikoff, 1954). Esto significa que, aun cuando el balance muestra desaparición de glicógeno, existe una síntesis (glicogénesis) que no alcanza a compensar la destrucción. Es necesario tener presente, entonces, que la desaparición o la síntesis neta de glicógeno, no reflejan sino el predominio de las reacciones en uno u otro sentido.

6. 5. INFLUENCIA DE LA FRUCTOSA.

La fructosa agregada al medio inhibe la desaparición del glicógeno en mayor grado que la glucosa. Esta diferencia es especialmente notoria en el medio de Krebs. En trece experimentos en que se utilizó este medio, el tanto por ciento de glicógeno inicial que resta al término de una hora de incubación fué de

un $76 \pm 8,8 \%$ en el caso de la fructosa y sólo de un $44 \pm 8,0 \%$ en el de la glucosa, en cortes de los mismos hígados. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0,02$). En experimentos realizados en medio KH, la diferencia entre el efecto de la fructosa y de la glucosa fué menor, pues mientras el contenido residual de glicógeno en presencia de glucosa es más alto que en el medio de Krebs, en presencia de fructosa es del mismo orden.

6. 6. INFLUENCIA DE LOS HEXOSAFOSFATOS.

Cuando se agregan al medio de incubación diversos hexosafosfatos en concentración de 30 mM/l, el contenido final de glicógeno hepático es diferente según el éster agregado. El G-6-P inhibe la desaparición del glicógeno de los cortes de hígado en cualquiera de los dos medios salinos empleados (Krebs o Hastings). En efecto, en catorce experimentos realizados en solución de Krebs, el contenido de glicógeno al término de 60 minutos de incubación fué de $39 \pm 5,7 \%$ del inicial, y en ocho experimentos en medio de Hastings, de $112 \pm 15,4 \%$. Los valores obtenidos con cortes de los mismos hígados, incubados con glucosa fueron de $55 \pm 6,1 \%$ y de $158 \pm 23,2 \%$, respectivamente. Sólo en tres experimentos en medio de Hastings se observó síntesis neta de glicógeno.

Cuando se compara la desaparición del glicógeno en presencia de otros hexosafosfatos (G-1-P, F-6-P y F-di-P), con la observada en testigos sin sustrato, se comprueba que las diferencias son muy pequeñas o nulas, como se analizará en el párrafo siguiente.

6. 7. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO QUE PRODUCEN LOS DIVERSOS SUSTRATOS.

En los párrafos anteriores hemos visto que los diversos sustratos ensayados ejercen una inhibición de distinto grado en la desaparición del glicógeno. El orden de actividad parece ser el siguiente:

fructosa > glucosa > G-6-P > G-1-P $\approx$ F-6-P $\approx$ F-di-P $\approx$ sin sustrato.

La importancia de las fluctuaciones individuales dificulta decidir si las diferencias observadas entre los efectos de algunos sustratos son reales o sólo son producidas por azar. Este problema ha podido ser dilucidado en experimentos pareados, en los cuales se sometieron cortes de un mismo hígado a la influencia de dos o más

TABLA 15

Comparación del efecto de diferentes sustratos sobre el glicógeno de cortes de hígado de rata (*).

Sustrato 1	Sustrato 2	N.º de exp.	Diferencia (**)	P (***)
Medio de Krebs				
Fructosa	Glucosa	13	+ $31,8 \pm 4,3$	< 0,001
Glucosa	G-6-P	14	+ $16,4 \pm 3,2$	< 0,001
G-6-P	Ninguno	14	+ $9,4 \pm 2,9$	< 0,01
F-6-P	Ninguno	11	+ $1,6 \pm 2,2$	> 0,4
F-di-P	Ninguno	9	- $6,3 \pm 8,1$	> 0,4
Medio de Hastings				
Glucosa	G-6-P	8	+ $45,0 \pm 16,0$	< 0,03
Glucosa	G-1-P	11	+ $62,2 \pm 12,6$	< 0,001
Glucosa	Ninguno	14	+ $68,6 \pm 14,3$	< 0,001
G-1-P	Ninguno	8	+ $6,4 \pm 8,8$	> 0,4

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa, 1955 b).

El glicógeno final (Gf) fué de $24,8 \pm 2,2$ por ciento del glicógeno inicial (Gi), cuando se usó la solución de Krebs sin sustrato como medio de incubación. El valor correspondiente para la solución de Hastings sin sustrato fué de $75,9 \pm 5,0 \%$.

(**) Para comparar el efecto de dos sustratos (1 y 2), se emplearon cortes del mismo hígado y se midió Gi y Gf en ambas condiciones. La diferencia, usada como criterio de comparación, se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: Diferencia = $100 (Gf_1 - Gf_2)/Gi$.

Los valores de la tabla corresponden a la media aritmética y su error típico.

(***) Los valores de P se dedujeron de $t = \text{media aritmética/error típico}$.

sustratos. En estas condiciones, para evitar la influencia de las fluctuaciones individuales, el análisis estadístico puede hacerse determinando, para cada caso, la diferencia entre el tanto por ciento de glicógeno que resta después de la incubación en presencia de un sustrato y de otro, o de un sustrato y de un testigo sin sustrato, de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\text{Diferencia} = 100 (G_{f1} - G_{f2}) / G_i$$

donde G_{f1} y G_{f2} representan la concentración final de glicógeno con dos sustratos diferentes, y G_i , la concentración inicial de glicógeno. El análisis estadístico se hace entonces determinando la media aritmética y el error típico de las diferencias así expresadas, y la significación se estudia considerando como t de Student la relación entre la media aritmética y su error típico, lo que supone una comparación con un valor teórico de 0 ± 0 . Los resultados obtenidos en experimentos de este tipo, analizados en la forma antes descrita, aparecen en la Tabla 15. De ellos se deduce que en el medio de Krebs el efecto de la fructosa es significativamente mayor que el de la glucosa ($P < 0,001$), y el de la glucosa, mayor que el del G-6-P ($P < 0,001$). El efecto inhibitorio del G-6-P es estadísticamente significativo, como puede apreciarse si se compara con el testigo sin sustrato ($P < 0,01$). Este análisis demuestra que no es significativa la inhibición de la glicogenólisis producida por el F-6-P ($P > 0,4$), ni por el F-di-P ($P > 0,4$).

Los experimentos realizados en medio de Hastings (Tabla 15) mostraron asimismo que el efecto de la glucosa es significativamente mayor que el del G-6-P ($P < 0,03$), y que el del G-1-P ($P < 0,001$). Este último no produce efecto, pues su diferencia con el testigo sin sustrato no es estadísticamente significativa ($P > 0,4$).

6. 8. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN SIMULTÁNEA DE GLUCOSA Y DE HEXOSAMONOFOSFATOS.

Como ayuda en la interpretación de algunos de los hechos presentados, realizamos algunos experimentos en los cuales el medio de incubación de los cortes de hígado se enriqueció simultáneamente con glucosa y con hexosamonofosfato. Los resultados, que serán discutidos posteriormente, se resumen en las Tablas 16 y 17. Ellos demuestran que la presencia de G-6-P o de F-6-P no modifica apreciablemente la influencia que la glucosa sola ejerce sobre el glicógeno hepático.

TABLA 16

Influencia de la adición simultánea de glucosa y de glucosa-6-fosfato, sobre el glicógeno hepático ().*

Experimento N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno residual (% del inicial) (**)			
		Sin sustrato	G-6-P	Glucosa	Glucosa + G-6-P
1	0,10	49	75	99	91
2	1,34	5	5	14	15
3	2,73	15	19	31	26
4	3,26	49	56	70	74

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa, no publicados.

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial que resta a los 60 minutos de incubación.

TABLA 17

Influencia de la adición simultánea de glucosa y de fructosa-6-fosfato, sobre el glicógeno hepático ().*

Experimento N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno residual (% del inicial) (**)			
		Sin sustrato	F-6-P	Glucosa	Glucosa + F-6-P
1	2,57	23	20	39	35
2	2,74	58	67	78	79
3	3,57	21	20	35	39

(*) Datos de Niemeyer y Figueroa, no publicados.

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial que resta a los 60 minutos de incubación.

6. 9. DISCUSIÓN.

Si se acepta que la formación de glicógeno a partir de la glucosa se hace a través de su conversión en G-6-P y G-1-P (§ 3. 3.), aparece muy extraño el hecho de que la acción inhibitoria que estos hexosafosfatos ejercen en la destrucción del glicógeno sea me-

nor que la de la glucosa misma. Se podría pensar que estos resultados paradójicos tienen su origen en una deficiente permeabilidad de las membranas de la célula hepática para los ésteres fosfóricos, como parece que ocurre en la célula muscular (Conway, 1942; Verzár y Wenner, 1948; Beloff-Chain, Chain, Bovet, Pocchiari, Catanzaro y Longinotti, 1953).

Sin embargo, los resultados presentados en los capítulos anteriores con respecto a la modificación del consumo de oxígeno y a la producción de ácido láctico, indican que los hexosafosfatos intervienen en el metabolismo, y que, por lo tanto, penetran al interior de la célula. Por otra parte, los datos referentes a la liberación de fosfato inorgánico por desdoblamiento de diversos ésteres fosfóricos, dan un nuevo apoyo a la idea de que la permeabilidad celular no es un factor limitativo de importancia tal que permita explicar los resultados paradójicos.

Otra posibilidad que es necesario considerar es la de que el ortofosfato liberado de los hexosafosfatos pudiera favorecer la fosforilación inicial del glicógeno, estimulando así la glicogenólisis. No obstante, esta posibilidad debe ser descartada, pues el incremento experimental de la concentración de fosfato inorgánico del medio no modifica la velocidad de desaparición del glicógeno, tanto en ausencia de sustrato como en presencia de glucosa (§ 6. 3. 4.).

Por otra parte, llama la atención el hecho de que el efecto que el G-6-P ejerce sobre la desaparición del glicógeno sea mayor que el del G-1-P. Es difícil conciliar este hecho con el esquema que explica la síntesis del glicógeno considerando estos hexosafosfatos como etapas intermedias obligadas, pues el G-1-P constituye en él la etapa más próxima al glicógeno.

Para interpretar correctamente los hallazgos experimentales aquí expuestos, nos hemos planteado la hipótesis de que la glucosa forme glicógeno por una vía que excluya como intermedios a los hexosafosfatos conocidos. Después de examinar nuevos datos experimentales acerca de la influencia de algunos fármacos en el metabolismo glucídico del hígado, volveremos sobre la discusión de esta hipótesis que plantea un problema de mucha importancia.

CAPÍTULO 7

ACTIVIDAD GLUCOSA-6-FOSFATASICA DEL HIGADO

7. 1. LIBERACIÓN DE FOSFATO INÓRGANICO A EXPENSAS DE HEXOSAFOSFATOS.

La liberación de fosfato inorgánico por desdoblamiento de los hexosafosfatos agregados en el medio donde se incuban cortes de hígado, representa una etapa metabólica que, estudiada en conjunto con las mediciones del ácido láctico producido, del consumo de oxígeno y de la formación del glicógeno, permite un mejor conocimiento de la importancia relativa que tienen las reacciones en que participan los glúcidos.

A causa de la influencia que ejerce la composición iónica del medio de incubación en algunos de los procesos metabólicos que ocurren en el hígado (§ 6. 2.), hemos realizado nuestros estudios sobre entrega de fosfato utilizando soluciones salinas de Krebs y de Hastings (Niemeyer, Figueroa y Figueroa, 1954).

Los resultados obtenidos con diversos hexosafosfatos en los dos medios de incubación empleados, se exponen en la Tabla 18. La cantidad de fosfato inorgánico liberado difiere notablemente de un sustrato a otro, y según el medio salino empleado. En efecto, los valores obtenidos con G-6-P son ligeramente superiores a los obtenidos con F-6-P, y ambos, claramente más altos que los conseguidos con F-di-P y con G-1-P. La liberación de fosfato inorgánico es menor en el medio de Hastings que en el de Krebs. Expresada en tanto por ciento, la disminución en medio de Hastings es mayor cuando el sustrato es G-1-P o F-di-P; pero expresada en valores absolutos, la diferencia es del mismo orden de magnitud o algo inferior a la observada con G-6-P. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los resultados obtenidos en ambos

medios salinos cuando los sustratos son el G-1-P y el F-di-P; pero la diferencia no es significativa cuando son el G-6-P o el F-6-P. Sin embargo, si se comparan los datos obtenidos en experimentos realizados en cortes provenientes del mismo hígado, se puede establecer que la liberación de fosfato a expensas del G-6-P es significativamente mayor ($P < 0,02$) en el medio de Krebs que en el de Hastings (Tabla 18). En experimentos de este tipo en los que se empleó F-6-P, la entrega de fosfato inorgánico no resultó significativamente diferente en ambos medios, a pesar de que hubo diferencia en cada uno de los tres experimentos realizados.

TABLA 18

Liberación de fosfato inorgánico a expensas de diversos hexosafosfatos, en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs y de Hastings ()*

Sustrato (30 mM/l)	Krebs (**)		Hastings		Experimentos pareados (***)		
	N.º de exp.	Pi liberado	N.º de exp.	Pi liberado	N.º de exp.	$\frac{H - K}{K} \cdot 100$	P
Glucosa-1-fosfato	5	$3,7 \pm 0,40$	12	$1,7 \pm 0,25$	5	$-54,8 \pm 11,7$	$< 0,01$
Glucosa-6-fosfato	10	$12,7 \pm 1,18$	8	$9,8 \pm 1,16$	5	$-21,8 \pm 5,0$	$< 0,02$
Fructosa-6-fosfato	7	$10,6 \pm 1,14$	4	$9,9 \pm 1,01$	3	$-15,0 \pm 10,2$	$> 0,80$
Fructosa-di-fosfato	12	$6,4 \pm 0,55$	5	$3,9 \pm 0,45$	3	$-38,0 \pm 4,4$	$< 0,02$

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa y Figueroa (1954).

(**) El fosfato inorgánico liberado se expresa en $\mu\text{M}/100$ mg tejido fresco/hora.

(***) En estos experimentos se utilizaron cortes provenientes del mismo hígado en ambos medios de incubación. $K = \text{Pi liberado en medio de Krebs}$ y $H = \text{Pi liberado en medio de Hastings}$.

7. 2. DIFUSIBILIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA.

Como ya se ha dicho (§ 5. 7.), diversas enzimas pueden difundirse desde los cortes de hígado hacia el medio de incubación, lo que explica la actividad metabólica que persiste en el medio después de haber retirado el tejido. Esto nos indujo a investigar la pre-

sencia de glucosa-6-fosfatasa en la solución salina en que se habían incubado cortes de hígado. Con este objeto se incubaron cortes de hígado de rata en solución de Krebs sin sustrato durante dos horas, al cabo de las cuales se extrajo el tejido y se agregó G-6-P en concentración de 30 mM/l. La titulación de fosfato inorgánico demostró que durante una hora de incubación del medio privado del tejido no hubo liberación apreciable de ortofosfato (Niemeyer, Figueroa y Figueroa, 1954). Hemos podido verificar posteriormente este hecho alterando algo las condiciones experimentales. En la Figura 23 se presentan los resultados de un experimento en que se

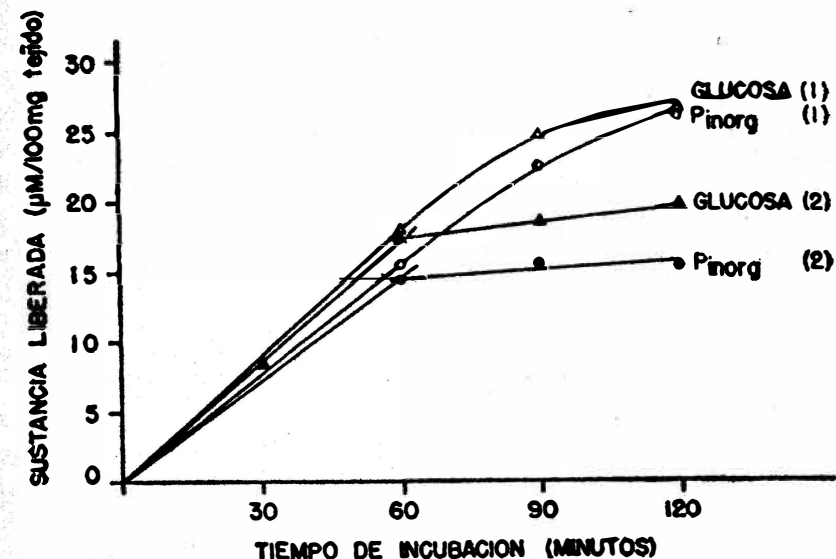


FIG. 23.—Liberación de glucosa y de fosfato inorgánico durante la incubación de cortes de hígado de rata en solución de Krebs que contiene glucosa-6-fosfato (30 mM/l). A los 60 minutos se retiraron los cortes en el vaso 2, mientras que el vaso 1 continuó como testigo con cortes. (Datos de Niemeyer, Figueroa y González, no publicados).

medió la liberación de fosfato inorgánico y de glucosa durante la incubación de cortes obtenidos de un mismo hígado de rata en dos vasos diferentes (1 y 2). Después de 60 minutos de incubación se extrajo el tejido del vaso 2 y se pudo comprobar que la liberación de glucosa y de fosfato cesó inmediatamente, mientras que continuaba en el vaso 1 en el cual se dejaron los cortes.

El hecho de que la G-6-fosfatasa no pase al medio de incubación es explicable, pues se ha demostrado que esta enzima se encuentra en las células estrechamente ligada a los microsomas (Hers, Berthet, Berthet y Duve, 1951).

Es importante destacar el hecho de que sólo en presencia de cortes de hígado los hexosafosfatos liberan fosfato inorgánico, pues representa una prueba concluyente de que la permeabilidad de las membranas de la célula hepática permite la fácil entrada de estas sustancias, contrariamente a lo que ocurre en el músculo (Conway, 1942; Verzár y Wenner, 1948; Beloff-Chain, Chain, Bovet, Pochiari, Catanzaro y Longinotti, 1953).

7. 3. INFLUENCIA DE LA GLUCOSA SOBRE LA DESFOSFORILACIÓN DEL GLUCOSA-6-FOSFATO.

Uno de los mecanismos invocados para explicar la influencia que ejerce la glucosa sobre el glicógeno hepático consiste en la frenación, por acción de masas, de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfatasa. Si bien teóricamente esto puede ocurrir, por cuanto se ha demostrado una cierta reversibilidad de las acciones fosfa-

TABLA 19

Influencia de la glucosa sobre la liberación de fosfato inorgánico a expensas de glucosa-6-fosfato en cortes de hígado incubados en medio de Krebs ().*

Experimento N.º	Fosfato liberado ($\mu\text{M}/100 \text{ mg tejido/hora}$)		
	G-6-P	G-6-P + glucosa	$\frac{(2) - (1)}{(1)} \times 100$
	(1)	(2)	(3)
1	10,1	7,4	- 27
2	10,8	8,9	- 18
3	10,2	8,9	- 13
4	22,3	20,1	- 10
Media arit.	13,4	11,3	- 17 $\pm$ 3,7(**)

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa y González, no publicados. La concentración de ambos sustratos era de 30 mM/l.

(**) $P < 0,02$.

ásicas (Meyerhof y Green, 1949), no podía asegurarse que tuviera lugar en los cortes de tejido. Con este objeto se comparó la liberación de fosfato inorgánico en cortes provenientes de un mismo hígado de rata incubado en solución de Krebs más glucosa-6-fosfato y en la misma solución adicionada de glucosa. Los resultados que aparecen en la Tabla 19, muestran que en las condiciones experimentales empleadas, la glucosa ejerce una inhibición de un $17 \pm 3,7 \%$ sobre la liberación de fosfato. Esta diferencia es estadísticamente significativa pues se trata de experimentos pareados ($P < 0,02$).

7. 4. DISCUSIÓN.

7. 4. 1. Los datos expuestos en la Tabla 18 señalan que el G-6-P y el F-6-P son desfosforilados con velocidad similar, lo que significa que la fosfohexoisomerasa es altamente eficiente, pues está demostrado que el F-6-P debe transformarse en G-6-P como etapa previa para su desfosforilación en el tejido hepático (Swanson, 1950; Duve, Berthet, Hers y Dupret, 1949). La actividad de las fosfatasas inespecíficas tanto la alcalina como la ácida, es insignificante en el pH en que se realizaron estos experimentos (Swanson, 1950; Cori y Cori, 1952).

El hecho de que las cantidades de fosfato liberado en presencia de G-1-P sean muy inferiores a las correspondientes al G-6-P, estaría indicando que la fosfoglucomutasa es un factor limitativo en esta defosforilación. Sin embargo, no disponemos de informaciones suficientes como para excluir la posibilidad de que el G-1-P penetre con menor facilidad al interior de las células.

En los experimentos realizados con F-di-P, llama la atención que la entrega de fosfato inorgánico es notablemente menor que cuando se utiliza F-6-P. Este hecho había sido observado anteriormente por Cori y Shine (1936), en condiciones experimentales similares a las nuestras. Teóricamente, sin embargo, la cantidad de fosfato liberado debiera ser mayor cuando se emplea F-di-P, por cuanto éste contiene dos moléculas de fosfato. Se podría pensar también en una limitación en la penetrabilidad de las membranas para el hexosafosfato; pero como la producción de ácido láctico y el consumo de oxígeno es mayor con F-di-P que con los hexosamonofosfatos, esta posibilidad debe ser excluida. Ha de pensarse que existe una limitación en la conversión de F-di-P en F-6-P, puesto que como ya vimos, la transformación de este último en G-6-P parece realizarse sin dificultad.

7. 4. 2. Un análisis comparativo de las diversas vías metabólicas del G-6-P muestra que su desfosforilación es cuantitativamente la más importante. En efecto, cuando el medio de incubación contiene inicialmente 60 μM de G-6-P, al cabo de una hora de incubación se obtienen aproximadamente 10 a 12 μM de fosfato inorgánico por cada 100 mg de tejido hepático. Este fosfato puede provenir tanto de la desfosforilación directa del G-6-P por acción de la glucosa-6-fosfatasa, como de la acción de la fosforilasa sobre el G-1-P, durante la hipotética síntesis de glicógeno por esta vía. Si calculamos el fosfato inorgánico que se liberaría suponiendo que el mayor contenido de glicógeno final de los cortes incubados en presencia del hexosafosfato proviniera en su totalidad de esta última reacción, este fosfato resultaría inferior a 1 μM , que es la cantidad correspondiente a la formación de 0,18 mg de glicógeno, expresado en glucosa, valor que no alcanza a obtenerse en ningún experimento. Durante la degradación metabólica del G-6-P, ya sea hasta el estado de ácido láctico o hasta el de anhídrido carbónico y agua, hay también entrega de fosfato. Sin embargo, desde un punto de vista estrictamente teórico, los radicales fosfatos no se separan como fosfato inorgánico, sino que se transfieren al sistema de los adenosín-polifosfatos (Cap. 3). Podría ocurrir que una parte de estos radicales formara fosfato inorgánico por la acción de algunas fosfatasa, como la ATPasa y otras; pero, en el mejor de los casos, la cantidad de fosfato así aparecida sería muy inferior a la que hemos encontrado en nuestros experimentos (§ 7. 1.). En efecto, si consideramos, por una parte, que la suma del ácido láctico aparecido y el exceso de consumo de oxígeno ocasionado por el G-6-P representa la cantidad de éster que se ha degradado y, por otra, que todo su radical fosfato aparece como fosfato inorgánico, no se explicaría sino la aparición de 1 μM de fosfato. Si una parte de los sustratos endógenos del tejido son sustituidos por G-6-P, podría superarse algo esa cifra, pues el consumo de oxígeno habitualmente observado es de 140 a 180 $\mu\text{l}/100\text{ mg/hora}$, y 134 μl de oxígeno corresponderían a la combustión íntegra de 1 μM de G-6-P.

De estos cálculos se puede concluir que la mayor parte del fosfato inorgánico que parece en el medio durante la incubación, proviene de la desfosforilación directa del G-6-P por acción fosfatásica. Así se explica el hecho de que no existe una diferencia mensurable en la liberación de fosfato en aerobiosis y en anaerobiosis (Niemyer, Figueroa y Figueroa, 1954).

La actividad de la G-6-fosfatasa que posee el hígado es muy superior a la de los demás tejidos de la rata, como puede apreciarse en los datos de Hers y Duve (1950) que aparecen en la Tabla 20. Resultados del mismo orden han sido publicados recientemente por Weber y Cantero (1955).

TABLA 20

Actividad glucosa-6-fosfatásica de diferentes tejidos de rata ().*

Tejido	Actividad (**)
Hígado	2,43
Riñón	0,75
Intestino	0,44
Bazo	0,03
Músculo	0,02
Corazón	0,02
Hueso	0,02
Cerebro	0,02
Estómago	0,01
Pulmón	0,01

(*) Datos de Hers y Duve (1950).

(**) mg de P inorgánico liberado en 10 minutos de incubación a 37° y pH 6,5 por g de tejido homogenizado. Los autores explican la actividad del intestino como la consecuencia de su acción fosfatásica inespecífica y señalan que los valores de 0,03 ya están fuera del margen de precisión del método.

7. 4. 3. La composición catiónica del medio de incubación influye en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, puesto que en el medio de Hastings se observa una menor liberación de fosfato inorgánico que en el medio de Krebs, lo cual no puede interpretarse como la consecuencia de las modificaciones que los cambios iónicos producen en otros aspectos del metabolismo. Esta disminución de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa podría explicar, al menos parcialmente, la influencia que el medio de Hastings ejerce sobre la glicogenólisis y la glicogénesis, ya que bloquearía la liberación de glucosa. El mismo mecanismo podría también explicar satisfactoria-

mente el hecho de que en los medios que favorecen la glicogénesis, el piruvato forma más glicógeno y menos glucosa que en los medios salinos de composición semejante a los líquidos extracelulares (Buchanan, Hastings y Nesbett 1949 *b*; Hastings, Teng, Nesbett y Sinex, 1952).

CAPÍTULO 8

INFLUENCIA DE ALGUNOS FARMACOS EN EL METABOLISMO HIDROCARBONADO

8. 1. INFLUENCIA DE LA FLORICINA.

8. 1. 1. La floricina es un glucósido que ha sido muy utilizado en el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono. En el animal entero, este fármaco da lugar al síndrome llamado diabetes floricinica, descrito por von Mering (1877), cuyas características sobresalientes son la glucosuria y la hipoglicemia. La participación del riñón en el desarrollo de este síndrome fué revelada cuando se comprobó que la extirpación de ambos riñones en los perros intoxicados con floricina impide la hipoglicemia (ref. en Peters y Van Slyke, 1946, pág. 255).

Más tarde, Lundsgaard (1933) logró demostrar que la floricina impide la reabsorción de la glucosa en los túbulos renales, y que en extractos musculares impide la formación de ácido láctico, fenómeno este último que se debería a una inhibición de la fosforilación inicial del glicógeno. Ostern, Guthke y Terzakowec (1936), y Cori, Colowick y Cori (1939) confirmaron esta acción fundamental cuando observaron, también en extractos musculares, que la floricina previene la formación de hexosamonofosfatos a partir de glicógeno y fosfato inorgánico. Posteriormente, Cori y Cori (1940) demostraron que también la síntesis de glicógeno a expensas del G-1-P es inhibida por la floricina, lo que ha permitido atribuir el efecto de este fármaco a la inhibición de la fosforilasa. Cori, Cori y Green (1943) confirmaron la acción inhibitoria de la floricina sobre esta enzima, trabajando con fosforilasa cristalina. El análisis de la cinética de la reacción indujo a estos autores a pensar que la inhibición no es de tipo competidor. Parece que la floricina tiene fuera de ésta,

otras acciones sobre el metabolismo que representan una inhibición en la utilización del ATP (Beck, 1942; Kaplan y Greenberg, 1943).

La glucosa ejerce sobre la fosforilasa una acción semejante a la de la floricina. En efecto, Lehmann (1938) demostró que en extractos musculares la glucosa en concentraciones elevadas, tiene la propiedad de inhibir la fosforilación inicial del glicógeno, es decir, la primera etapa de su degradación. Sus resultados fueron confirmados por Gill y Lehmann (1939), y por Cori, Colowick y Cori (1939). Por otra parte, Cori y Cori (1940) demostraron que en páncreas de hígado de gato, la glucosa también inhibe la formación de glicógeno a expensas de G-1-P; este efecto es proporcional a la concentración de glucosa, y disminuye cuando se aumenta el G-1-P, lo cual es un indicio de que la inhibición es de tipo competidor. El análisis cuantitativo de este fenómeno muestra que las afinidades de la glucosa y del G-1-P con el fermento son aproximadamente iguales. Cori, Cori y Green (1943) estudiaron mejor la cinética de la inhibición utilizando fosforilasa cristalina, y comprobaron que la inhibición producida por la glucosa sobre la síntesis de glicógeno a expensas de G-1-P era de tipo competidor. En varios de estos trabajos se pudo demostrar que una acción semejante a la de la glucosa no era ejercida por otros azúcares, tales como fructosa, galactosa, manosa, maltosa, ni por el G-6-P (Gill y Lehmann, 1939; Cori, Colowick y Cori, 1939; Cori y Cori, 1940).

Este conjunto de antecedentes nos indujo a estudiar la influencia de la floricina sobre los procesos de degradación y de síntesis del glicógeno que ocurren en cortes de hígado de rata (Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953; Cruz Coke, Niemeyer y Figueroa, 1954). El análisis comparativo de los resultados obtenidos con floricina y de los observados en los cortes incubados en presencia de glucosa, permitiría aclarar parcialmente algunos de los problemas planteados con respecto a la influencia de las hexosas y de sus ésteres fosfóricos sobre el glicógeno hepático (Cap. 6).

8. 1. 2. *Influencia de la floricina en la desaparición de glicógeno.*— En la Tabla 21 se exponen los resultados obtenidos en los experimentos en que se agregaron concentraciones variables de floricina a la solución de Krebs donde se incuban los cortes de hígado de rata. Para apreciar mejor la influencia del fármaco, se exponen también los datos referentes al efecto que produce la glucosa en cortes obtenidos de los mismos hígados. Los experimentos muestran

que la floricina inhibe el consumo de oxígeno y frena la desaparición del glicógeno. La inhibición de la glicogenólisis es proporcional a la concentración del fármaco y se observa aún cuando ésta es sólo de 0,25 mM/l. En general, el efecto de la floricina es superior al que se obtiene con glucosa en una concentración diez veces más alta. En un experimento en el que se agregaron simultáneamente glucosa y floricina se observó una adición de sus efectos (Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa, 1953).

TABLA 21

Influencia de la floricina sobre la evolución del glicógeno en cortes de hígado de rata, incubados en medio de Krebs ().*

Exp. N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno final (%) (**)				
		Sin adición	Con glucosa (***) 30	Con floricina (***)		
				1,2	2,5	3,7
1	0,30	0,06	0,15	0,09	0,12	—
2	1,33	0,09	0,16	0,13	0,21	0,24
3	1,47	0,37	0,66	0,40	0,44	0,85

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa, Marich, Camus y Figueroa (1953).

(**) Contenido de glicógeno después de una hora de incubación.

(***) Concentración expresada en mM/l.

8. 1. 3. *Influencia de la floricina sobre la síntesis de glicógeno.*— En otra serie de experimentos se estudió el efecto de la floricina en condiciones en que se observa síntesis neta de glicógeno (Cruz Coke, Niemeyer y Figueroa, 1954). Con este objeto se incubaron los cortes de hígado en solución de Hastings enriquecida con glucosa. En este medio, la floricina prácticamente no altera la síntesis neta de glicógeno, como puede observarse en la Tabla 22, que resume nuestros experimentos. El efecto que produce la floricina en medio de Hastings sin sustrato, en cambio, es semejante al que se obtiene en los experimentos en los cuales se utilizó solución de Krebs, o sea, consiste en una inhibición de la glicogenólisis que no llega nunca a ocasionar síntesis neta de glicógeno.

TABLA 22

Influencia de la floricina sobre el contenido de glicógeno, en cortes de hígado incubados durante 60 minutos en solución de Hastings glucosada ().*

Experimento N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno final (%) (**)		
		Glucosa	Glucosa + floricina	$\frac{(3) - (2)}{(2)} \times 100$
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	0,09	0,37	0,26	- 29,7
2	0,65	0,56	0,55	- 1,8
3	0,77	0,94	0,91	- 3,2
4	0,84	1,04	1,02	- 1,9
5	0,88	1,11	0,94	- 15,7
6	2,13	2,39	2,25	- 5,9
Media arit.		1,07	0,99	- 9,6 ± 4,5 (***)

(*) Datos de Cruz-Coke, Niemeyer y Figueroa, 1953.

(**) Contenido de glicógeno después de una hora de incubación.

(***) La concentración de glucosa era de 30 mM/l y la de floricina de 2,5 mM/l. $P > 0,08$.

8. 1. 4. *Discusión.*—Los resultados expuestos muestran que en ciertas condiciones experimentales la floricina ejerce sobre el metabolismo del glicógeno efectos similares a los que produce la glucosa y que en otras condiciones da lugar a efectos diferentes.

Así, la floricina frena la desaparición del glicógeno hepático cuando la degradación predomina sobre la síntesis, como ocurre en el medio de Krebs con o sin sustrato y en el medio de Hastings sin sustrato. Esta acción puede explicarse como consecuencia del efecto inhibitorio sobre la fosforilasa. No se puede invocar como interpretación de este fenómeno una posible formación de glicógeno a partir de las unidades de glucosa contenidas en el fármaco, pues este aporte resulta muy escaso en las concentraciones activas.

En el caso de la glucosa, su influencia sobre el glicógeno hepático puede explicarse de ambas maneras, o sea, por formación de glicógeno o como resultado de la inhibición de la fosforilasa. Esta interpretación es perfectamente comprensible cuando se aplica a

cortes de hígado en los cuales predomina la degradación del glicógeno. Así se podría explicar la diferencia observada entre la glucosa y los hexosafosfatos con respecto a la influencia que ejercen sobre el glicógeno hepático (Cap. 6). Cuando el medio de incubación se enriquece simultáneamente con G-6-P y con glucosa, debería observarse un mayor efecto sobre el glicógeno que el que correspondería a la suma de sus acciones propias, ya que por una parte se dispondría del precursor de glicógeno representado por el G-6-P y por otra, estaría presente un inhibidor de la glicogenólisis, la glucosa. Sin embargo, nuestros experimentos han demostrado que el efecto de la acción combinada de G-6-P y glucosa es del mismo orden que el observado con glucosa sola (§ 6. 8), lo que constituye un indicio de que la inhibición que la glucosa ejerce sobre la fosforilasa no es muy importante. Conviene considerar, además, que esta acción inhibitoria no permite explicar los resultados obtenidos en los cortes de hígado incubados en solución de Hastings. En este medio, la glucosa da lugar a una síntesis neta de glicógeno (§ 6. 4. 3), lo que significa que los procesos de síntesis predominan sobre los de degradación. Si la síntesis de glicógeno a partir de glucosa tuviera como única vía la catalizada por la fosforilasa, serían incompatibles la inhibición de la enzima y la síntesis de glicógeno. Esto induce a pensar que la glucosa no ejerce una acción inhibitoria sobre la fosforilasa, o bien, que la glucosa contribuye a la formación de glicógeno por una vía que no requiere fosforilasa y que por lo tanto no tiene el G-1-P como compuesto intermedio. La función principal de la fosforilasa consistiría, pues, en transformar el glicógeno en G-1-P, y de esta manera el efecto inhibitorio que la glucosa ejerce sobre la enzima repercutiría sólo en el proceso de la degradación del glicógeno hepático. Apoyan esta idea los experimentos que muestran que en el medio de Hastings enriquecido con glucosa, la floricina no es capaz de frenar la síntesis neta de glicógeno producida por el azúcar.

Volveremos a comentar estos problemas en la discusión general (Cap. 9).

8. 2. INFLUENCIA DEL 2,4-DINITROFENOL (DNF).

8. 2. 1. En párrafos anteriores hemos discutido la posibilidad de que la síntesis de glicógeno a partir de glucosa se realice por una vía que no requiere la formación intermedia de G-6-P y de G-1-P. Como la síntesis de glicógeno es una reacción endergónica, es de

esperar que ella se encuentre inhibida en las circunstancias en que la formación de enlaces ricos en energía está disminuida o impedida.

El DNF es una droga que previene la generación de enlaces fosfóricos ricos en energía, asociada al transporte de electrones desde los nucleótidos piridínicos hasta la citocromo-oxidasa (Loomis y Lipmann, 1948; Cross, Taggart, Covo y Green, 1949; Hunter y Spector, 1951). Esta propiedad del DNF explica su efecto inhibitorio sobre las reacciones endergónicas que requieren esta clase de energía.

Las consideraciones anteriores nos movieron a realizar experimentos tendientes a conocer el efecto que produce el DNF sobre la acción de la glucosa en el glicógeno hepático, así como relacionar este efecto con las modificaciones en el consumo de oxígeno que el fármaco provoca. Estos experimentos con DNF nos permitirían tener una idea aproximada de la posible participación que la glucosa tiene en la regulación de los procesos de glicogénesis y glicogenólisis a través de su propiedad de inhibir la actividad fosforilásica, puesto que una acción directa de la glucosa sobre esta enzima no debiera ser afectada por el DNF.

8. 2. 2. Influencia del DNF sobre la desaparición del glicógeno en cortes de hígado incubados en ausencia de sustrato.—Los experimentos realizados en cortes de hígado incubados en medio de Krebs sin adición de sustrato, muestran que cuando el contenido de glicógeno es bajo la desaparición del glicógeno no es afectada por la presencia del DNF, en cambio cuando es elevado, se observa que el glicógeno que resta en presencia de DNF, es sólo un 80% del existente cuando no se agrega el fármaco (Fig. 24).

En el medio salino KH (§ 6. 3. 3) el DNF aumenta la desaparición del glicógeno en forma mucho más acentuada que cuando se emplea solución de Krebs. Esto puede ser interpretado como la consecuencia de que la síntesis de glicógeno a expensas de la glucosa liberada durante la glicogenólisis es mayor en el medio KH que en el medio de Krebs, y de que esta síntesis fuera el proceso afectado por el DNF. El efecto del DNF es máximo cuando el contenido inicial de glicógeno es vecino del 1%, condición en la cual el glicógeno final en presencia de DNF resulta inferior a la décima parte del testigo sin fármaco; a partir de esta concentración, mientras mayor es el contenido inicial de glicógeno de los cortes, el efecto del DNF es menor. Sin embargo, cuando el contenido inicial del glicógeno

es menor que el 1%, la acción del DNF se hace también menos evidente (Fig. 24), de modo que el contenido final de glicógeno en presencia de DNF resulta del orden del 60% del testigo sin fármaco.

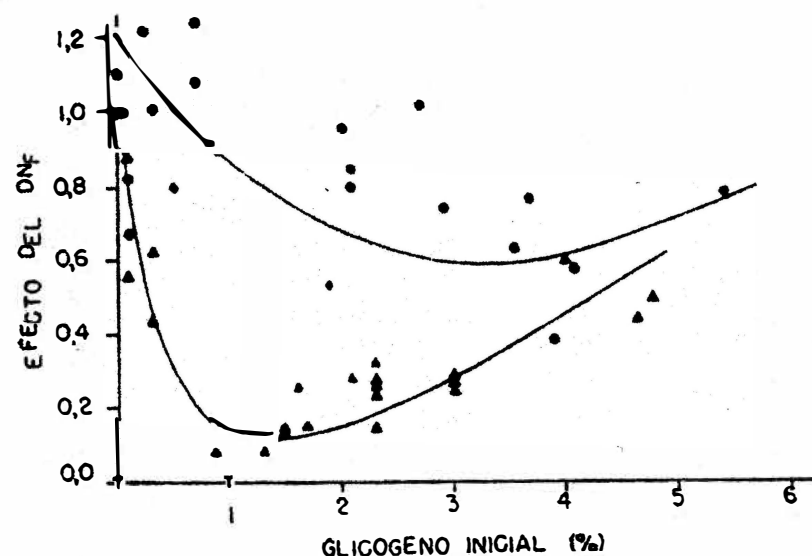


FIG. 24.—Influencia del contenido inicial de glicógeno sobre el efecto que produce el 2,4-dinitrofenol en la desaparición de glicógeno en cortes de hígado de rata, incubados en medios sin sustrato. El efecto del DNF está expresado como el cuociente entre el glicógeno residual a los 60 minutos de incubación en presencia y en ausencia del fármaco. Los círculos corresponden a experimentos realizados en medio de Krebs y los triángulos, en medio KH. (Datos de Niemeyer, Figueroa y González, por publicar).

8. 2. 3. Influencia del DNF sobre el efecto de la glucosa y de la fructosa en el glicógeno hepático.—Como se ha discutido anteriormente (Cap. 6), la glucosa y la fructosa inhiben la desaparición del glicógeno en los cortes de hígado. La presencia de DNF interfiere en este efecto de las hexosas, lo que ha podido demostrarse sometiendo cortes de un mismo hígado a las diversas condiciones experimentales. El análisis de los resultados se complica, por el hecho de actuar dos variables, a saber: la presencia o ausencia de hexosa y la presencia o ausencia de DNF. Para realizar ese análisis, designaremos el contenido de glicógeno al término del período de la incubación, en cada condición experimental, de la siguiente manera:

- a = en medio salino sin agregados;
 b = en medio salino + hexosa;
 c = en medio salino + DNF,
 d = en medio salino + hexosa + DNF.

La influencia del DNF sobre el efecto de la hexosa agregada al medio resulta así expresada por la relación:

$$Z = \frac{d - c}{b - a}$$

Si $Z = 1$ quiere decir que el DNF no interfiere en el efecto de la hexosa; si $Z < 1$ significa que el DNF inhibe la acción de las hexosas, y si $Z > 1$ significa que el DNF favorece este efecto.

El estudio del valor de Z en los distintos experimentos, muestra que existe una variación entre ellos, que es función del contenido inicial de glicógeno en los cortes. En efecto, como puede apreciarse en las Figuras 25 y 26 el valor de Z es pequeño en los cortes con

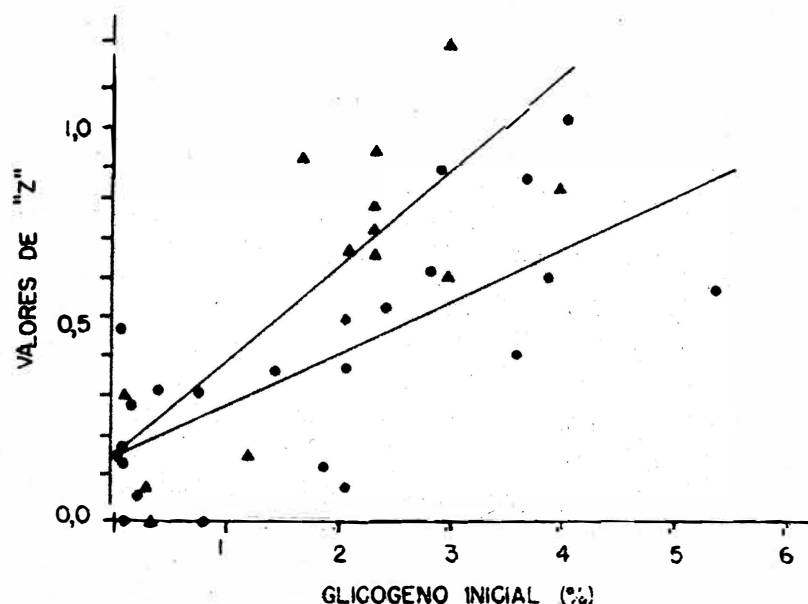


FIG. 25.—Influencia del contenido inicial de glicógeno sobre el efecto que produce el 2,4-dinitrofenol en la acción de la glucosa y de la fructosa sobre el glicógeno que resta en cortes de hígado de rata después de 60 minutos de incubación en medio de Krebs. (Datos de Niemeyer, Figueroa y González, por publicar).

bajo contenido de glicógeno ($< 1\%$) y, al contrario, se acerca a la unidad en los cortes con alto contenido de glicógeno ($> 3\%$). Esto quiere decir que cuando el contenido inicial de glicógeno es bajo, el DNF inhibe claramente el efecto que la hexosa ejerce sobre el glicógeno; mientras que cuando el glicógeno inicial es elevado, esta acción del DNF es apreciablemente menor. El análisis estadístico de esta variación indica que entre el contenido de glicógeno y el valor de Z , existe una correlación significativa. En el caso de la glucosa, $r = + 0,76$ ($P < 0,01$) y en el de la fructosa, $r = + 0,82$ ($P < 0,01$), cuando la incubación se hace en medio de Krebs. En los experimentos realizados en solución KH, r vale $+ 0,73$ ($P < 0,05$) para la glucosa y $+ 0,78$ ($P < 0,01$) para la fructosa.

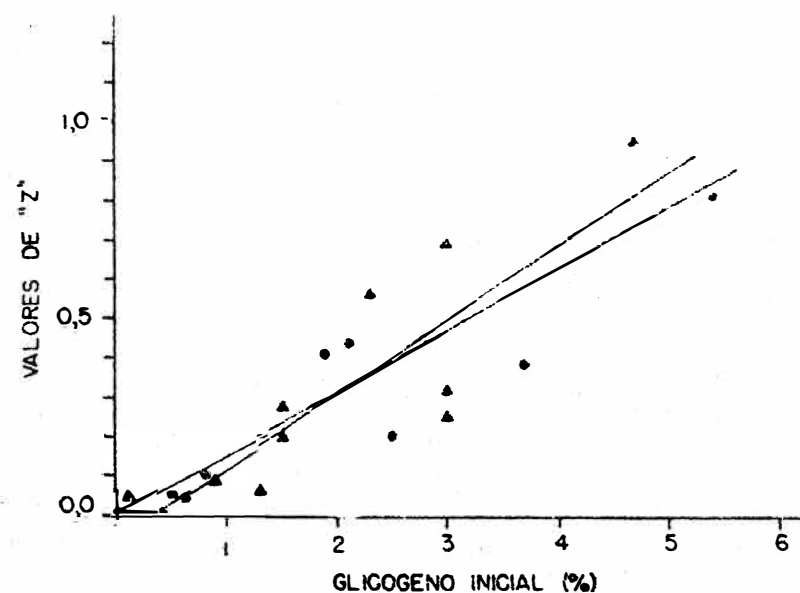


FIG. 26.—Representa lo mismo que la Fig. 25 en experimentos en los que la incubación se realizó en medio KH. (Datos de Niemeyer, Figueroa y González, por publicar).

8. 2. 4. Influencia del 2,4-Dinitrofenol sobre la entrega de glucosa por los cortes de hígado.—La Tabla 23 contiene los datos obtenidos en experimentos en que se estudia la entrega de glucosa por cortes de hígado incubados en medio de Krebs sin sustrato, en presencia y ausencia de DNF. En ella puede observarse que el fármaco no

modifica apreciablemente la liberación de glucosa, aún en los casos en que existiendo un bajo contenido de glicógeno la producción de glucosa supera la desaparición de glicógeno (§ 6. 3. 2). Estos datos permiten emitir una hipótesis explicativa de los resultados señalados en el párrafo 8. 2. 2., asunto sobre el cual volveremos más adelante (§ 8. 3. 5).

TABLA 23

Efecto del 2,4-dinitrofenol (0,1 mM/l) sobre la entrega de glucosa al medio en que se incuban cortes de hígado de rata (*).

Experimento N.º	Glicógeno inicial %	Glucosa liberada (mg/100 mg tejido/hora)	
		Sin DNF	Con DNF
1	0,29	1,07	1,17
2	0,38	0,91	0,75
3	0,61	0,91	0,81
4	0,94	1,10	1,12
5	2,12	1,83	1,74
6	2,52	1,39	1,04

(*) Datos de Niemeyer, Figueroa y González, por publicar. Los experimentos fueron realizados en medio de Krebs. El análisis estadístico muestra que las diferencias observadas con y sin DNF no son significativas ($P > 0,1$).

8. 2. 5. *Influencia del DNF en el consumo de oxígeno de cortes de hígado.*—Como el efecto del DNF sobre el glicógeno hepático demostró variaciones importantes que son consecuencia del contenido de glicógeno inicial existente en los cortes, era necesario estudiar de qué manera el diverso contenido inicial de glicógeno interviene en la influencia que el DNF ejerce sobre el consumo de oxígeno en cortes de hígado. Los resultados obtenidos en cortes de hígado de ratas, cuyo diverso contenido de glicógeno se obtuvo sometiendo al animal a ayuno previo de duración variable, se resumen en la Figura 27. En ella puede apreciarse que en presencia de DNF en concentración de 0,1 mM/l, los cortes que tienen un contenido inicial de glicógeno bajo experimentan una notable disminución del consumo de oxígeno, que llega hasta un 50%, mientras que aquellos

que tienen un contenido elevado, manifiestan un incremento de la respiración que llega hasta un 30%. La modificación del consumo de oxígeno ocasionada por el DNF, guarda una relación lineal con el logaritmo de la concentración inicial de glicógeno.

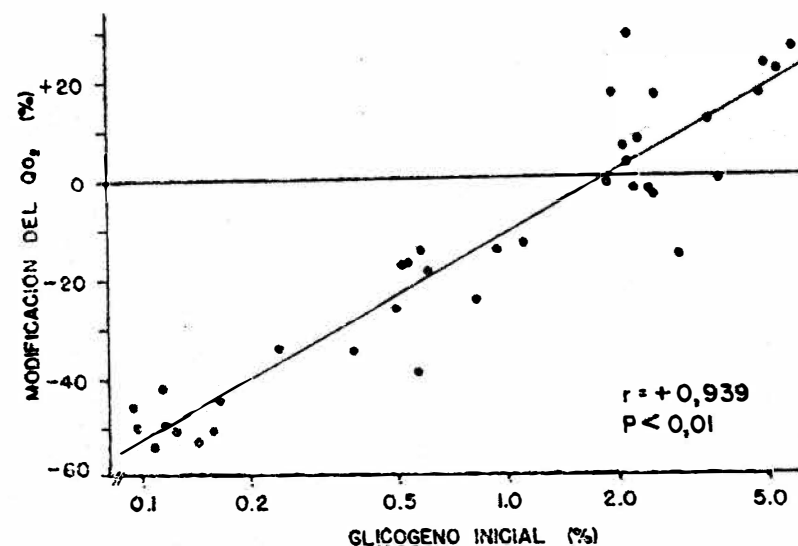


FIG. 27.—Influencia del contenido inicial de glicógeno sobre la modificación del consumo de oxígeno ocasionada por el DNF (0,1 mM/l) en cortes de hígado de rata, durante la primera hora de incubación en medio de Krebs. Cada punto representa un animal diferente. El diverso contenido de glicógeno inicial es la consecuencia de tiempos variables de ayuno. (Datos de Niemeyer y Figueroa, 1955 a).

Trabajando en cortes provenientes del mismo hígado, es posible también establecer la relación que existe entre el efecto del DNF sobre el consumo de oxígeno y el contenido de glicógeno del corte. En las condiciones empleadas en este estudio (medio de Krebs), el glicógeno tiende a desaparecer durante la incubación, y se observa que el DNF estimula la respiración en los primeros 10 a 20 minutos, mientras que después ocasiona una inhibición que guarda paralelismo con el descenso del glicógeno producido en el tejido (Niemeyer y Figueroa, 1955 a).

La relación entre el contenido de glicógeno y la acción del DNF aparece también evidente cuando la variación del contenido de glicógeno se obtiene en diversos cortes del mismo hígado mediante

incubación previa durante tiempos variables. Los resultados de un experimento de esta clase se muestran en la Figura 28. En ella puede verse que en los cortes estudiados después de una incubación previa de una, dos y tres horas, el glicógeno disminuye gradualmente y que el efecto del DNF varía en el mismo sentido que en los cortes que presentan diverso contenido inicial de glicógeno determinado por ayuno del animal.

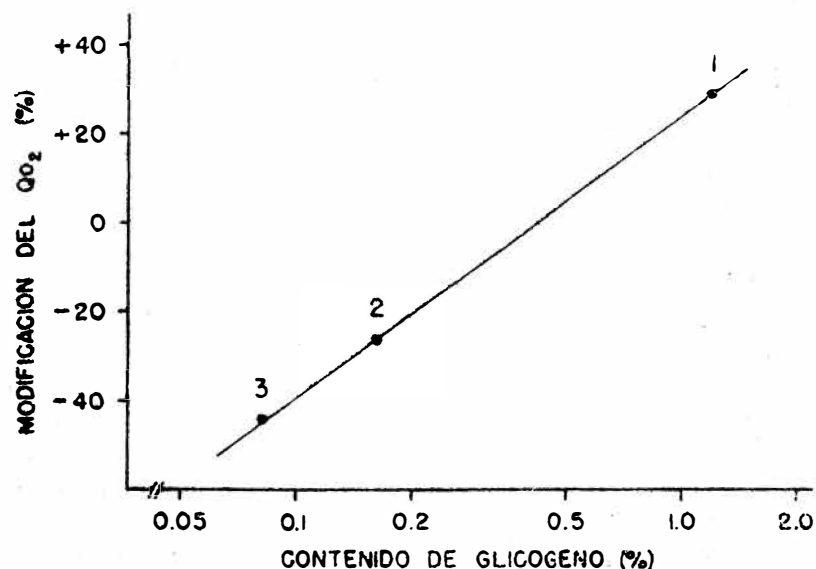


FIG. 28.—Influencia del contenido de glicógeno de cortes de hígado de la misma rata, sobre el efecto del DNF (0,1 mM/l) en el consumo de oxígeno. Las cifras colocadas sobre los puntos representan el tiempo de incubación previa, en horas. (Datos de Niemeyer y Figueroa, 1954).

Si se analiza la influencia que ejercen diversas concentraciones de DNF sobre la respiración de cortes de hígado con diferentes niveles de glicógeno, también se observa una notable influencia del contenido inicial de glicógeno, como puede apreciarse en los resultados resumidos en la Figura 29. En efecto, cuando el corte posee un *alto* contenido de glicógeno, el DNF generalmente estimula las oxidaciones en las diversas concentraciones estudiadas. En cambio, cuando el contenido de glicógeno es *bajo*, se observa sólo la acción inhibitoria del DNF. Cuando el contenido de glicógeno presenta valores

intermedios, las concentraciones bajas del DNF estimulan el consumo de oxígeno y las altas lo reducen.

En la interpretación de estos resultados es importante considerar el hecho de que en los cortes de hígado con bajo contenido

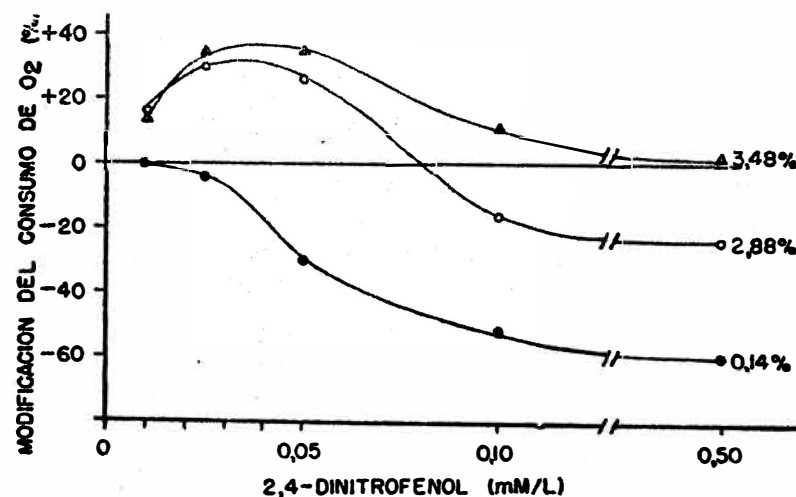


FIG. 29.—Influencia del contenido inicial de glicógeno sobre el efecto que ejercen concentraciones variables de 2,4-dinitrofenol sobre el consumo de oxígeno en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs. Las cifras colocadas a continuación de las líneas representan la concentración inicial de glicógeno de los respectivos hígados. (Datos de Niemeyer y Figueroa, 1955 a).

de glicógeno, la presencia de ATP en el medio de incubación impide que se manifieste la acción inhibitoria del DNF. La Figura 30 ilustra este aserto con un experimento típico.

8. 2. 6. *Discusión.*—De acuerdo con los datos de que se dispone, intentaremos explicar los hallazgos experimentales referentes a la acción del DNF sobre el metabolismo del tejido hepático.

Como ya se ha dicho (§ 8. 2. 1.), la acción general del DNF consiste en una inhibición de la fosforilación oxidativa; pero su mecanismo íntimo de acción no está totalmente dilucidado. Sin embargo, los datos experimentales más recientes parecen indicar que el DNF favorece la hidrólisis del ATP, o más bien de su precursor, es decir, del compuesto con enlace fosfórico rico en energía que se formaría como primera etapa durante el proceso de la fosforilación

oxidativa (Hunter, 1951; Potter y Recknagel, 1951; Lardy y Wellman, 1952; Jalil, 1952; Lardy y Wellman, 1953; Witter, Newcomb y Stotz, 1953). Esta manera de actuar permite explicar el hecho de que el DNF estimule las oxidaciones celulares, lo que sucede en animales enteros (ref. en Peters y Van Slyke, 1946), en varios tipos de células intactas (ref. en Guadarrama, 1955) y en mitocondrias aisladas (Hunter, 1951; Potter y Recknagel, 1951; Lardy y Wellman, 1952; Jalil, 1952). En efecto, se puede pensar que las oxidaciones celulares están autolimitadas por la disponibilidad de acep-

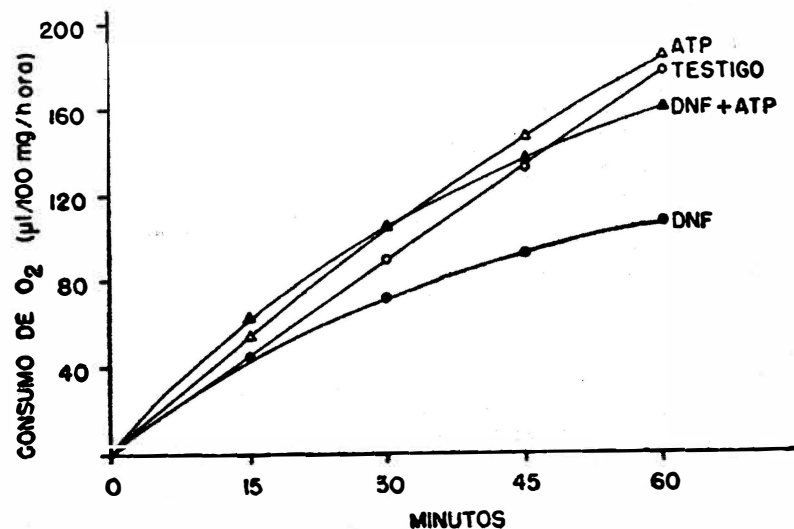


FIG. 30.—Influencia del Adenosíntrifosfato sobre el efecto del 2,4-dinitrofenol en la respiración de cortes de hígado de rata. (Datos de Niemeyer y Figueroa, 1955 a).

tores de fósforo durante la fosforilación oxidativa (§ 3. 8. 2.). Así, cuando se favorece por cualquier mecanismo la descomposición del ATP hasta ADP, el consumo de oxígeno aumenta. Esto se ha observado cuando a una suspensión de mitocondrias aisladas se agregan, sistemas que convierten el ATP en ADP, como por ejemplo: hexoquinasa + glucosa (Niemeyer, Crane, Kennedy y Lipmann, 1951 y 1953; Hunter, 1951; Rabinovitz, Stulberg y Boyer, 1951; Lardy y Wellman, 1952; Plaut y Plaut, 1952; Johnson y Ackermann, 1953); creatínfosfoquinasa + creatina (Belitzer, 1939; Lardy y Wellman, 1952; Niemeyer y Jalil, 1954); precursores de la síntesis

de citrulina (Siekevitz y Potter, 1953), y fermentos que producen la hidrólisis del ATP (Niemeyer y Jalil, 1953). Hay pues motivos para suponer que la estimulación de las oxidaciones ocasionada por el DNF sería la consecuencia de la liberación del aceptor primario del ortofosfato.

Estos antecedentes permiten pensar que el efecto del DNF sobre el consumo de oxígeno en los cortes de hígado depende fundamentalmente de la calidad del o de los sustratos que la célula está utilizando. Así, el DNF inhibiría la respiración en las condiciones en que predomina la utilización de los sustratos que requieren ser activados por el ATP, tal como ocurre en las mitocondrias suspendidas en presencia de ácidos grasos (Lipmann y Kaplan, 1947; Knox, Noyce y Auerbach, 1948). En cambio, el DNF podría manifestar su efecto estimulante de las oxidaciones cuando la célula utiliza preferentemente sustancias que no requieren ATP para iniciar su catabolismo.

Ahora bien, no cabe duda de que los cortes de hígado incubados en un medio que no contiene sustrato, mantienen su respiración oxidando un conjunto de diversos sustratos endógenos. La participación relativa de los hidratos de carbono, de los aminoácidos y de las grasas en este conjunto, podría variar según el contenido de glicógeno del tejido. Cuando el glicógeno se halla en pequeñas cantidades, hay razones para suponer que se oxidan preferentemente ácidos grasos y sólo una pequeña proporción de hidratos de carbono. Apoyan esta suposición, nuestros resultados experimentales que muestran la existencia de una relación directa entre el contenido de glicógeno en los cortes de hígado y la producción de ácido láctico en aerobiosis (§ 5. 2.). En el mismo sentido puede interpretarse el descenso que experimenta el cuociente respiratorio, en cortes de hígado de animales en ayuno, fenómeno que ha sido observado por diversos investigadores (§ 4. 2. 4.).

De esta manera puede explicarse el hecho de que cuando el contenido de glicógeno es *bajo* el DNF ocasiona un descenso de la respiración, el que sería la consecuencia de dos fenómenos simultáneos: (i) la inhibición de la fosforilación oxidativa producida por el DNF, la cual previene la «activación» de los ácidos grasos, etapa previa necesaria para su degradación, y (ii) la escasa producción de ATP en reacciones insensibles al DNF, como son las que ocurren en la etapa de triosafosfatos durante la degradación del glicógeno (§ 3. 5. 2.).

Apoyan esta manera de interpretar los hechos los resultados obtenidos en experimentos realizados con adición de diversos sustratos al medio de incubación (Niemeyer y Figueroa, 1955a). Así, cuando en el medio en que se incuban cortes de hígado con *bajo* contenido de glicógeno, se agregan sustratos para cuya utilización se requiere una activación inicial con ATP (ácidos grasos y monosacáridos no fosforilados), no se altera fundamentalmente el efecto inhibitorio del DNF sobre la respiración; en cambio, cuando se adicionan sustratos que no requieren la acción del ATP (F-di-P, piruvato, algunos componentes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y algunos L-aminoácidos), el consumo de oxígeno en presencia de DNF se eleva significativamente, y a veces logra sobrepasar el de los cortes testigos incubados con el mismo sustrato y sin DNF. Esto quiere decir que los últimos sustratos se comportan, a este respecto, del mismo modo que el glicógeno endógeno del tejido. En otros tejidos, como riñón, cerebro, testículo y bazo, hemos observado que existe también una estrecha relación entre el efecto del DNF sobre el consumo de oxígeno y la calidad del sustrato colocado en el medio de incubación (Niemeyer, Guadarrama, González y Figueroa, por publicar).

Un apoyo más a esta interpretación se halla en el hecho de que el efecto inhibitorio del DNF sobre la respiración de cortes de hígado incubados sin sustrato o en presencia de ácidos grasos, se suprime cuando en el medio de incubación se agrega ATP (§ 8. 2. 4).

Por otra parte, si el contenido de glicógeno de los cortes es *alto*, la oxidación de ácidos grasos sería menor y aumentaría proporcionalmente la degradación del glicógeno. En estas condiciones, los enlaces fosfóricos ricos en energía (ATP) producidos en reacciones insensibles al DNF durante la degradación del polisacárido, serían suficientes para permitir la oxidación de otros sustratos endógenos o exógenos que requieren ser activados por el ATP. De esta manera, el DNF mostraría sólo su acción estimulante de las oxidaciones celulares, ya que existirían en el tejido las condiciones necesarias para que esos sustratos fueran utilizados. Así se explicaría que cuando cortes con elevado contenido en glicógeno se incuban en un medio enriquecido con butirato, el DNF ocasiona un aumento importante de la respiración. De un modo general, en presencia de cualquiera de los sustratos ensayados, el DNF ocasiona un aumento del consumo de oxígeno en los cortes que presentan un contenido elevado de glicógeno (Niemeyer y Figueroa, 1954 y 1955a).

La influencia que ejerce el contenido de glicógeno de los cortes de hígado sobre el efecto del DNF en la oxidación de algunos sustratos, permite explicar el estímulo de la oxidación del ácido octa-noico en cortes de hígado de ratas *sin ayuno*, observado por Fantl, Lincoln y Nelson (1951), sin que sea necesario aceptar, como lo hacen los autores, que la oxidación de los ácidos grasos no requiere una activación a expensas de la energía del ATP.

Las diferencias en la respuesta metabólica que presentan los cortes de hígado con diverso contenido de glicógeno cuando se incuban en presencia de concentraciones variables de DNF, pueden interpretarse como la consecuencia de balances diferentes entre los efectos estimulantes e inhibidores del fármaco. Es necesario tener presente que el efecto inhibitorio puede estar contrarrestado por la producción de ATP en reacciones insensibles al DNF, como ocurre con la fosforilación «a nivel del sustrato» durante la oxidación del aldehído D-3-fosfoglicérico y del α -quetoglutarato, como también en la deshidratación del 2-fosfoglicerato que produce fosfoenol-piruvato (§ 3. 5. 2 y § 3. 8. 2).

Ha sido necesario hacer todas estas consideraciones para interpretar satisfactoriamente la estrecha relación que existe entre el contenido de glicógeno del hígado y la acción del DNF sobre el efecto glicogenético de la glucosa y de la fructosa. Estos monosacáridos constituirían sustrato para la síntesis del glicógeno en una reacción que requiere energía que debe ser proporcionada directa o indirectamente por el ATP. La presencia del DNF ocasionaría una inhibición de esta síntesis cuando la producción de ATP en reacciones insensibles a la droga es escasa, situación que se presentaría en los cortes con *bajo* contenido de glicógeno. En cambio, en los cortes con *alto* contenido de glicógeno se puede suponer que la cantidad de ATP producida en reacciones insensibles a la droga, bastaría para contrarrestar la acción del fármaco, permitiendo así la síntesis del glicógeno a expensas del monosacárido.

Los resultados expuestos en el párrafo 8. 2. 4. permiten pensar que cuando en los cortes de hígado ocurre una formación de glucosa a expensas de sustratos no glucídicos, esta gliconeogénesis no es afectada por el DNF. Este hecho nos parece de importancia por cuanto induce a pensar que en los cortes con muy reducido contenido de glicógeno (menos del 1%), está ocurriendo una gliconeogénesis de glicógeno insensible al DNF. Este asunto que es del más alto interés, requiere un estudio más profundo.

La acción del DNF sobre el efecto de la glucosa, cuando se trabaja en condiciones que permiten que esta acción se manifieste, hace pensar que la intervención del monosacárido en los procesos de síntesis y de degradación del glicógeno hepático corresponde fundamentalmente al de síntesis del glicógeno y sólo muy secundariamente, si es que en realidad ocurre, al de inhibición directa de la fosforilasa.

Esta interpretación relativa a la influencia del contenido de glicógeno en la producción de ATP en cierto tipo de reacciones, permite explicar también el hecho de que la fructosa sólo ocasione una sobreproducción de ácido láctico en los cortes de hígado incubados en anaerobiosis en el caso de que su contenido de glicógeno sea elevado (animales sin ayuno) (§ 5. 4). En las condiciones de anaerobiosis debemos pensar que la fosforilación oxidativa está bloqueada de modo que el ATP necesario para activar la fructosa sólo puede derivar de la producción de enlaces fosfóricos a nivel de las triosas, en reacciones que se pueden realizar en ausencia de oxígeno. La magnitud de estas reacciones depende, como ya lo hemos señalado, del contenido de glicógeno del tejido. Esta misma interpretación se puede dar para explicar el papel protector que ejerce el glicógeno hepático con respecto a las alteraciones metabólicas inducidas en cortes de hígado por la exposición a la anaerobiosis (Craig, 1943).

8. 3. INFLUENCIA DEL ALDEHIDO DL-GLICÉRICO Y DEL L-SORBOSA-1-FOSFATO.

8. 3. 1. Desde que Mendel (1929) descubrió que en cortes de sarcoma de Jensen y de cerebro de rata, el aldehido DL-glicérico inhibe casi completamente la formación de ácido láctico a partir de glucosa, numerosos autores han demostrado que un efecto semejante se produce en diversas preparaciones de estos y de otros tejidos. Así, se ha observado la inhibición ocasionada por la acción del aldehido glicérico en papillas y extractos de los siguientes tejidos: cerebro (Holmes, 1934; Adler, Calvet y Günther, 1937; Rudney, 1949), músculo (Holmes, 1934; Adler, Calvet y Günther, 1937; Boyland y Boyland, 1938; Süllmann, 1939; Stickland, 1941; Rudney, 1949), tumores (Adler, Calvet y Günther, 1937; Rudney, 1949) y embrión de pollo (Needham y Nowinski, 1937), como también en levaduras (Adler, Calvet y Günther, 1937; Rudney, 1949). Se ha demostrado que este efecto es causado por el isómero levógiro (Needham y Leh-

mann, 1937 b; Mendel, Strelitz y Nundell, 1938; Rudney, 1949; Lardy, Wiebelhaus y Mann, 1950).

Las investigaciones realizadas con el objeto de explicar el mecanismo de acción del aldehido glicérico, han conducido a las siguientes conclusiones:

(i) Esta sustancia no es capaz de inhibir la glicólisis anaeróbica producida a expensas de polisacáridos o de hexosafosfatos, lo que hace pensar que actúa en la reacción catalizada por la hexoquinasa (Needham y Lehmann, 1937 a y b; Adler, Calvet y Günther, 1937; Baker, 1937; Süllmann, 1939; Rudney, 1949; Lardy, Wiebelhaus y Mann, 1950).

(ii) El aldehido glicérico no modifica la respiración ni la glicólisis aeróbica de diversos tejidos, tales como sarcoma de Jensen, cerebro, hígado y riñón de rata (Mendel, 1929).

(iii) El efecto del aldehido no es directo, sino que es la consecuencia de la formación de otro cuerpo activo, el L-sorbosa-1-fosfato (S-1-P), que resulta de la interacción del aldehido L-glicérico y del dihidroxiacetónfosfato, en presencia de aldolasa (Lardy, Wiebelhaus y Mann, 1950).

(iv) El S-1-P ejerce una inhibición de la hexoquinasa, de carácter no competidor, lo que ha sido demostrado en el fermento obtenido de extractos acetónicos de cerebro de buey (Lardy, Wiebelhaus y Mann, 1950), y

(v) El piruvato contrarresta parcial o totalmente el efecto del aldehido glicérico (Mendel, Bauch y Strelitz, 1931; Stickland, 1941); pero su acción no es constante y depende de la clase de preparación usada (Rudney, 1949). Este fenómeno se ha explicado suponiendo que en presencia de piruvato la coenzima I permanece oxidada y que esto facilitaría la oxidación del triosafosfato; de esta manera se impediría su condensación con el aldehido L-glicérico que da lugar al cuerpo activo (Lardy, Wiebelhaus y Mann, 1950).

La capacidad que poseen tanto el S-1-P como su predecesor, el aldehido L-glicérico, para inhibir específicamente a la hexoquinasa, nos indujo a estudiar el efecto que producen estas sustancias sobre la reacción $\text{glucosa} \rightleftharpoons \text{glicógeno}$ en cortes de hígado. Esperábamos que el análisis de estos efectos diera luz en el conocimiento de las características de esta reacción, puesto que si la formación de glicógeno fuera inhibida en presencia de estas sustancias, se podría pensar que el proceso requiere la actividad hexoquinásica; si, por el contrario, no fuera afectada la formación de glicógeno, este

hecho constituiría un argumento más para pensar que en ella no se necesita la hexoquinasa.

8. 3. 2. *Influencia del aldehído DL-glicérico.*—En la Tabla 24 se muestran los resultados referentes a las modificaciones que sufre el contenido de glicógeno en cortes de hígado, cuando se incuban durante una hora en medio de Krebs en presencia de aldehído

TABLA 24

Influencia del aldehído DL-glicérico sobre el contenido de glicógeno en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs, con y sin glucosa ().*

Exp. N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno residual (% del inicial) (**)			
		Sin sustrato	Ald. glicérico	Glucosa	Ald. glicé- rico + glu- cosa
1	1,53	5	9	18	21
2	2,80	8	7	14	13
3	4,10	34	40	51	52
4	4,34	25	27	58	67
5	4,59	43	50	61	71

(*) Datos de Figueroa, Niemeyer y González, por publicar. La concentración de la glucosa fué de 30 mM/l; la del aldehído DL-glicérico de 10 mM/l, con la excepción del experimento 2, en el cual fué de 20 mM/l.

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial que resta a los 60 minutos de incubación.

DL-glicérico. El análisis de los datos muestra que esta sustancia no ejerce ningún efecto apreciable en la evolución del contenido de glicógeno en el hígado. En el diafragma de rata, en cambio, el aldehído DL-glicérico inhibe la formación de glicógeno a partir de la glucosa agregada al medio de incubación, como puede apreciarse en la Tabla 25.

8. 3. 3. *Influencia del L-sorbose-1-fosfato.*—La adición de S-1-P al medio de incubación no modifica significativamente la evolución del glicógeno en cortes de hígado incubados en solución de Krebs sin sustrato o con glucosa (Tabla 26). Tampoco se observa un efecto inhibitorio sobre la formación de glicógeno en el diafragma de rata (Tabla 27).

TABLA 25

Influencia del aldehído DL-glicérico sobre el contenido de glicógeno en el diafragma de rata, incubado en medio de Krebs, con y sin glucosa ().*

Experimento N.º	Glicógeno final (%) (**)			
	Sin sustrato	Ald. glicérico	Glucosa	Ald. glicérico + glucosa
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	0,04	0,04	0,16	0,05
2	0,14	0,16	0,33	0,20
3	0,17	0,19	0,38	0,25
4	0,20	—	0,29	0,21
5	0,20	0,27	0,35	0,28
6	0,21	0,16	0,44	0,30
Media arit.	0,16	0,16	0,33	0,22

(*) Datos de Figueroa, Niemeyer y González, por publicar. La concentración de glucosa fué de 30 mM/l; la de aldehído DL-glicérico de 10 mM/l.

(**) Contenido de glicógeno después de una hora de incubación. La diferencia entre la media aritmética de las columnas (3) y (4) es $0,11 \pm 0,01$ ($P < 0,001$).

TABLA 26

Influencia del L-sorbose-1-fosfato (S-1-P) sobre el contenido de glicógeno en cortes de hígado de rata incubados en medio de Krebs, con y sin glucosa.

Experimento N.º	Glicógeno inicial %	Glicógeno residual (% del inicial) (**)			
		Sin sustrato	S-1-P	Glucosa	S-1-P + glucosa
1	1,04	10	8	15	15
2	2,92	29	35	50	51
3	3,64	32	28	45	44

(*) Datos de Figueroa, Niemeyer y González, por publicar. La concentración de la glucosa era de 30 mM/l; la del S-1-P de 1 mM/l en los experimentos 1 y 2 y de 2 mM/l en el experimento 3.

(**) Tanto por ciento del glicógeno inicial que resta a los 60 minutos de incubación.

TABLA 27

Influencia de L-sorbose-1-fosfato (S-1-P) sobre el contenido de glicógeno en el diafragma de rata, incubado en medio de Krebs con y sin glucosa ().*

Experimento N.º	Glicógeno final (%) (**)			
	Sin sustrato	S-1-P	Glucosa	S-1-P + glucosa
1	0,12	0,06	0,22	0,31
2	0,08	0,10	0,18	0,21
3	0,31	0,45	0,55	0,66

(*) Datos de Figueroa, Niemeyer y González, por publicar. La concentración de glucosa era de 30 mM/l; la del L-sorbose-1-P de 1 mM/l en los experimentos 1 y 2 y de 2 mM/l en el experimento 3.

(**) Contenido de glicógeno después de una hora de incubación.

8. 3. 4. *Discusión.*—Los resultados expuestos, si bien no son concluyentes, hablan en favor de la idea de que la formación de glicógeno a partir de glucosa en el hígado, no requiere necesariamente la acción catalítica de la glucoquinasa. En efecto, si bien el aldehído DL-glicérico ejerce un efecto inhibitorio en el diafragma, no tiene ninguna influencia sobre la glicogénesis que sucede en el hígado. Es posible que esta ausencia de actividad sea la consecuencia de la aerobiosis, que crearía condiciones inapropiadas para la formación del cuerpo activo a expensas del aldehído L-glicérico. Si así fuera, no se explicaría la diferencia observada entre su efecto en el hígado y en el diafragma.

Para obviar este inconveniente, propio del aldehído glicérico, se recurrió al S-1-P. Con esta sustancia tampoco hubo inhibición del efecto que produce la glucosa sobre el contenido de glicógeno, aún cuando se la empleó en concentraciones de 10 a 20 veces superiores a las que Lardy, Wiebelhaus y Mann (1950) emplearon en sus experimentos con hexoquinasa de cerebro. Lo curioso es que en el diafragma de rata, a diferencia de lo observado con el aldehído glicérico, el S-1-P no ejerce efecto sobre la glicogénesis. Podría pensarse en una deficiente permeabilidad de las membranas de las cé-

lulas musculares al S-1-P, tal como ocurre en el caso de otros hexosafosfatos. Esta explicación resulta difícilmente aceptable para el hígado, en donde el S-1-P ocasiona un incremento del consumo de oxígeno que alcanza a un $10 \pm 2,4 \%$, hecho que indica que la sustancia ha penetrado en la célula.

DISCUSION GENERAL

9. 1. Los hechos fundamentales que suministran los resultados discutidos en los capítulos anteriores pueden resumirse en la forma siguiente:

(i) La glucosa no aumenta la respiración de cortes de hígado de rata; en cambio, los hexosafosfatos, el piruvato y diversos componentes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos producen en estos mismos cortes un aumento en el consumo de oxígeno que varía entre un 10% y un 25%, según sea el sustrato empleado (Cap. 4);

(ii) La sobreproducción de ácido láctico por cortes de hígado de rata es mayor en presencia de G-6-P que de glucosa a igual concentración (Cap. 5), y

(iii) La presencia de glucosa en el medio de incubación inhibe la desaparición del glicógeno en los cortes de hígado y, en ciertas condiciones experimentales, da lugar a una síntesis neta de glicógeno. Este efecto de la glucosa es inferior al que produce la fructosa, y superior al que ocasiona el G-6-P en condiciones similares. Otros hexosafosfatos, como el G-1-P, el F-6-P y el F-di-P, no intervienen apreciablemente en la desaparición del glicógeno (Cap. 6).

9. 2. Los resultados observados en la medición del consumo de oxígeno y en la producción de ácido láctico sugieren que una etapa limitativa en la degradación de la glucosa es su conversión en G-6-P. Esta conversión es posible en forma directa bajo la influencia de una glucoquinasa en presencia de ATP.

Los resultados relativos al efecto que ejercen las hexosas y sus ésteres fosfóricos sobre el glicógeno de cortes de hígado, no armonizan bien con los esquemas actualmente aceptados referentes a la

vía de formación del glicógeno. En efecto, en estos esquemas se considera que en la glicogénesis realizada a expensas de glucosa, la primera etapa que debe cumplirse es su conversión directa en G-6-P. Este es luego transformado en G-1-P, el que a su vez sería el precursor de las unidades de glucosa que van a alargar las cadenas del glicógeno. Si así ocurriera, no se comprendería por qué la glucosa es mejor formadora de glicógeno que el G-6-P, y éste, mejor que el G-1-P (§ 6. 7). Se ha descartado ya la posibilidad de que este menor efecto de los hexosafosfatos sea la consecuencia de un aumento de la concentración de fosfato inorgánico en el medio de incubación, pues el enriquecimiento experimental del medio con fosfato inorgánico hasta lograr concentraciones superiores a las obtenidas después de una hora de incubación con hexosafosfatos, no ejerce ninguna influencia apreciable en la formación de glicógeno a partir de glucosa (§ 6. 3. 4).

Estos hechos conducen a pensar que la formación de glicógeno a expensas de glucosa se verifica por una vía que excluye al G-6-P y al G-1-P como compuestos intermedios obligados. Su papel de intermedios necesarios quedaría, pues, limitado al proceso de la degradación del glicógeno. De acuerdo con esta hipótesis, el efecto del G-6-P sobre el glicógeno hepático sería ocasionado por la glucosa que de él se libera mediante la acción de la glucosa-6-fosfatasa.

9. 3. El esquema clásico según el cual la vía de la glicogénesis sería glucosa $\rightarrow$ G-6-P $\rightarrow$ G-1-P $\rightarrow$ glicógeno, proviene de trabajos realizados *in vitro* con fermentos purificados. Ellos demuestran que en presencia de fosforilasa cristalina puede realizarse la interconversión del glicógeno en G-1-P. Esta reacción es reversible; no obstante, para obtener la formación de glicógeno se requieren condiciones muy especiales, una de las cuales es la ausencia de fosfato inorgánico en el medio de incubación.

Cuando se plantea el problema de decidir si los fenómenos observados en sistemas enzimáticos aislados ocurren también en la célula, es necesario averiguar si en ella existen las condiciones requeridas. En nuestro caso se trata, pues, de averiguar si existen en las células las condiciones adecuadas para que se realice la síntesis de glicógeno a partir de G-1-P bajo la influencia de la fosforilasa. Desde luego, la célula tiene un contenido de fosfato inorgánico suficiente como para pensar que sería difícil la síntesis de glicógeno por esta vía. En efecto, según los resultados obtenidos por Rapoport,

Leva y Guest (1943), la concentración de fosfato inorgánico es de $17,8 \pm 0,6$ mg por 100 g de hígado, en ratas alimentadas, y de $29,3 \pm 0,6$ mg por 100 g de hígado, en ratas con 24 horas de ayuno. Estas cifras corresponden aproximadamente a 7,5 y 12,0 mM/l de líquido celular. Por otra parte, el G-1-P no sólo está en equilibrio con el glicógeno, sino que también con el G-6-P, en una reacción catalizada por la fosfoglucomutasa. Esta última reacción tiende a desplazarse en el sentido de la formación de G-6-P, de acuerdo con sus características cinéticas, puesto que cuando en presencia de fermento purificado el equilibrio está establecido, existe un 6 % de G-1-P y un 94 % de G-6-P (§ 3. 3.). El desplazamiento de esta reacción es de tal importancia que para poder sintetizar glicógeno a partir de G-6-P bajo la acción de fosfoglucomutasa y de fosforilasa, Sutherland, Colowick y Cori (1941) necesitaron agregar bario en el medio de incubación, para precipitar el fosfato inorgánico a medida que se iba produciendo por acción de la fosforilasa. Estos experimentos demuestran lo difícil que es obtener la síntesis de glicógeno por la vía G-6-P $\rightarrow$ G-1-P $\rightarrow$ glicógeno.

9. 4. Conviene analizar los mecanismos por los cuales la presencia de glucosa pudiera favorecer las reacciones del esquema clásico en el sentido de la síntesis de glicógeno. Ellos pueden resumirse en la forma que se detalla a continuación:

(i) La glucosa se transformaría directamente en G-6-P bajo la acción de la glucoquinasa y del ATP, dando lugar a una acumulación de G-6-P, el que por acción de masas favorecería la formación de G-1-P y de glicógeno. Es necesario tener presente, sin embargo, que la actividad glucoquinásica del hígado es muy reducida; en cambio, la actividad de la glucosa-6-fosfatasa es muy elevada de donde resulta poco verosímil que este mecanismo sea eficiente.

(ii) La glucosa podría frenar, por acción de masas, la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, favoreciendo así la acumulación de G-6-P. Si bien los experimentos de Meyerhof y Green (1949) demuestran la reversibilidad de las acciones fosfatásicas, el equilibrio de la reacción está fuertemente desplazado en el sentido de la hidrólisis del éster, de modo que no parece ser muy importante una acción de esta naturaleza. Sin embargo nuestros experimentos muestran que la presencia de glucosa en concentración de 30 mM/l, modifica sensiblemente la desfosforilación del G-6-P (§ 7. 3).

Ninguno de los dos mecanismos hipotéticos que hemos mencionado podría explicar los resultados obtenidos en nuestros experimentos con respecto a la diferente capacidad glicogenética de la glucosa y de los hexosafosfatos. En efecto, en ambos casos la glucosa sólo contribuiría a aumentar la concentración de G-6-P en el interior de la célula, condición que se cumple mejor cuando se colocan concentraciones elevadas de G-6-P en el medio de incubación, como parece indicarlo el aumento del consumo de oxígeno y de la producción de ácido láctico que el éster ocasiona (Caps. 4 y 5).

(iii) Todavía podría pensarse en un tercer mecanismo de acción de la glucosa, el que no podrían compartir los hexosafosfatos. Como se ha comentado en el párrafo 8. 1. 1., diversos investigadores han observado que la glucosa frena la producción de G-1-P a expensas de glicógeno y fosfato inorgánico, así como también inhibe la liberación de fosfato inorgánico ocasionada por la acción de la fosforilasa sobre el G-1-P, cuando éste da origen a glicógeno. Estos hechos han llevado a la conclusión de que la glucosa es capaz de inhibir la acción de la fosforilasa en ambos sentidos de la reacción. El efecto es propio de la glucosa, ya que no lo producen ni el G-6-P, ni la fructosa ni otros azúcares. La acción inhibitoria de la glucosa se ha observado tanto utilizando papillas de tejidos como fosforilasa cristalizada.

Los experimentos relativos a la acción del DNF (§ 8. 2. 3.) sugieren que el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la fosforilasa es de poca importancia en los cortes de hígado, por lo menos en la concentración empleada. Así, pudo demostrarse que tanto la acción de la glucosa como la de la fructosa sobre el glicógeno hepático son inhibidas en forma apreciable por el DNF, fenómeno que es especialmente notorio cuando los cortes de hígado poseen un bajo contenido de glicógeno. La acción inhibitoria de la glucosa sobre la fosforilasa no debiera, en realidad, ser afectada por la presencia del DNF, pues esa acción es provocada por la glucosa libre.

Si la acción de la glucosa sobre la fosforilasa se ejerciera, ella sólo podría contribuir a la inhibición de la glicogenólisis, observada en los cortes de hígado en las condiciones en que la degradación del glicógeno predomina sobre su síntesis. Se explicaría en estos casos la diferencia que existe entre la glucosa y sus ésteres fosfóricos con relación a sus efectos sobre el glicógeno hepático; pero quedaría sin explicación lo que ocurre con la fructosa.

Por otra parte, si se acepta que la síntesis de glicógeno se realiza por acción catalítica de la fosforilasa, la acción inhibitoria de la glucosa sobre esta enzima no permite explicar el hecho de que en ciertas condiciones experimentales se produce una síntesis neta de glicógeno a partir de glucosa.

Las condiciones anteriores sugieren entonces dos posibilidades: (a) que el efecto inhibitorio de la glucosa no se ejerce en los cortes de hígado, quedando entonces sin comprenderse las diferencias observadas entre la glucosa y los hexosafosfatos, o bien (b) que existe la acción inhibitoria, pero que la fosforilasa no participa en forma importante en la síntesis de glicógeno, quedando su función relegada a su degradación.

En resumen el análisis de los mecanismos posibles a través de los cuales puede la glucosa contribuir a la síntesis de glicógeno, lleva al convencimiento de que los esquemas clásicos son incapaces para explicar satisfactoriamente todos los hechos experimentales. En cambio, estos hechos podrían explicarse si se acepta que la glucosa contribuye a la síntesis de glicógeno a través de reacciones que no tienen como compuestos intermedios al G-6-P y al G-1-P y que son catalizadas por sistemas enzimáticos entre los cuales no se incluye la fosforilasa.

9. 5. Diversas observaciones concuerdan con la hipótesis de la existencia de una vía diferente a la clásica para conducir a la formación de glicógeno a partir de glucosa. Hemos comentado en el párrafo 8. 1. 1. que la fosforilasa puede ser inhibida por la floricina, inhibición que se manifiesta en ambos sentidos de la reacción catalizada por la enzima cristalizada. Pues bien, nuestros experimentos han mostrado que la floricina inhibe la degradación de glicógeno en los cortes de hígado, cuando éstos se incuban en un medio que favorece la glicogenólisis, lo que se explica por su efecto inhibitorio de la fosforilasa. Sin embargo, el glucósido no logra inhibir la síntesis neta de glicógeno cuando los cortes son suspendidos en medio de Hastings enriquecido con glucosa (párrafo 8. 1. 3.). Este hecho suministra un apoyo a la hipótesis de que la síntesis de glicógeno no sería catalizada por la fosforilasa.

Esta misma idea aparece también sustentada por los experimentos realizados por Sutherland y Cori (1951), con adrenalina y con factor hiperglicemiante-glicogenolítico del páncreas (factor HG). Estos autores han demostrado que estas dos hormonas estimulan

la glicogenólisis, tanto en el animal entero como en los cortes de hígado y han interpretado esta acción como el resultado de un estímulo de la reactivación de la fosforilasa. Si bien en condiciones experimentales muy especiales, que permiten la síntesis de glicógeno a expensas del G-1-P en extractos de hígado, se ha demostrado que la adrenalina y el factor HG favorecen esa síntesis por aumentar la actividad de la fosforilasa, estas dos sustancias sólo manifiestan una acción glicogenolítica en cortes de hígado y en animales enteros. Sutherland (1951 *b*) considera que estos resultados plantean un problema muy importante que requiere mayor investigación, ya que ellos no se compadecen con el esquema que explica la síntesis y la degradación del glicógeno por acción de la fosforilasa en uno u otro sentido. En nuestra opinión, tales resultados pueden explicarse si se acepta que la síntesis del glicógeno se hace por una vía en la que no interviene la fosforilasa, y que la función de esta enzima queda limitada a la etapa inicial de la degradación del glicógeno.

Las observaciones referidas en los párrafos 8. 3. 2. y 8. 3. 3. que muestran que los inhibidores de la hexoquinasa no modifican la influencia que la glucosa ejerce sobre el glicógeno hepático, también favorecen la hipótesis de que no es necesaria la conversión de glucosa en G-6-P como etapa previa en la síntesis de glicógeno.

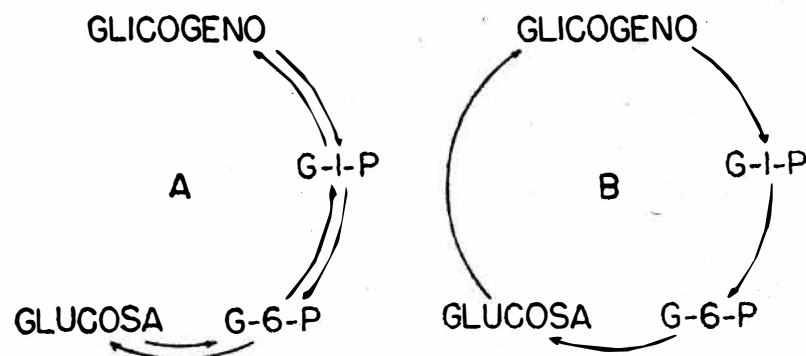


FIG. 31.—Representación esquemática de las interrelaciones que pueden existir entre glucosa, glicógeno y hexosafosatos.

El conjunto de hechos que hasta aquí hemos discutido nos conduce a pensar que las intertransformaciones que se producen en el hígado entre la glucosa y el glicógeno no se verificarían siguiendo los procesos esquematizados en la Figura 31 A, sino más bien de acuerdo con el esquema B de la misma Figura.

Diversas otras consideraciones han conducido a Beloff-Chain, Catanzaro, Chain, Masi, Pocchiari y Rossi (1955) a pensar que en el músculo la síntesis de glicógeno se realiza también por una vía diferente a la de su degradación.

9. 6. Aún cuando los experimentos expuestos no permiten por ahora adelantar más en el conocimiento de este nuevo camino que conduciría de la glucosa al glicógeno, ellos proporcionan una orientación sobre las características que podría tener esta vía.

La incorporación de la glucosa en el glicógeno debe producirse en una reacción endergónica, por cuanto representa la creación de enlaces glucosídicos. La idea de que la energía necesaria para la síntesis provenga directa o indirectamente del ATP, nace no sólo del papel general que esta sustancia desempeña en el metabolismo, sino que tiene además un apoyo importante en la influencia que el DNF ejerce en los cambios del contenido de glicógeno en cortes de hígado, como se discutió en el párrafo 8. 2. 3.

Es evidente que para lograr la síntesis del glicógeno se requiere que el glicógeno o la glucosa estén «activados», es decir, que se haya constituido previamente un enlace entre una de las dos moléculas reaccionantes y otra sustancia. De este modo la reacción debería ser de alguno de los dos tipos siguientes:

- (1) Glucosil-X + glicógeno → glucosil-glicógeno + X
- (2) X-glicógeno + glucosa → glucosil-glicógeno + X

Nos inclinamos a pensar que la reacción se produce de acuerdo con la ecuación (1) por cuanto ésta tendría mayor tendencia que la (2) a desplazarse en el sentido de la síntesis de glicógeno, puesto que el ligamen glucosídico tiene en general un mayor contenido energético que la unión éster. En las ecuaciones hipotéticas presentadas, la unión glucosil-X sería de carácter glucosídico, mientras que la unión X-glicógeno sólo podría tener el carácter de éster. En el mismo sentido hablan los resultados de los experimentos realizados con fructosa. En efecto, ya hemos visto que en los cortes de hígado de rata la fructosa forma glicógeno con mayor velocidad que la glucosa, impidiendo por lo tanto la desaparición del glicógeno con mayor eficiencia que los ésteres fosfóricos ensayados (§ 6. 7.). De este hecho se deduce que los hexosafosatos no pueden ser metabolitos intermedios en la reacción fructosa → glicógeno. Ahora bien,

para que la fructosa pueda formar glicógeno es necesario que previamente se transforme en glucosa; sin embargo, de acuerdo con los datos señalados debe aceptarse que esta transformación no produce glucosa *libre*. Esto conduce a pensar que la fructosa se convierte en una forma especial de glucosa, apta para entrar en la reacción de síntesis del glicógeno, forma que podría ser, por ejemplo, el glucosil-X de la reacción (1). La velocidad con que se forma este glucosil-X sería entonces mayor a partir de fructosa que a partir de glucosa. Si el glicógeno fuera el «activado» (reacción 2) sería preciso aceptar que la fructosa se convierte en glucosa *libre*, y por lo tanto no se explicaría el hecho de que la fructosa forme glicógeno con mayor facilidad que la glucosa.

En resumen, estos antecedentes conducen a pensar que en la conversión de la glucosa en glicógeno se produciría como etapa intermedia la formación de un glucosil-X, que representaría la forma «activada» de la glucosa, precursora inmediata en la formación de glicógeno (Fig. 32).

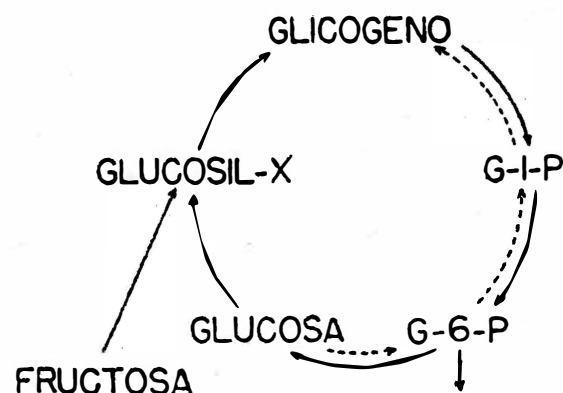
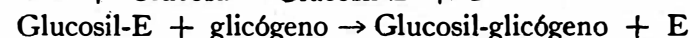
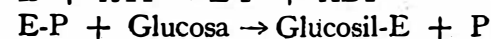
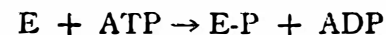


FIG. 32.—Esquema de las relaciones hipotéticas entre hexosas y glicógeno. Las flechas interrumpidas representan el sentido menos probable de las reacciones. El glucosil-X es un intermedio hipotético.

9. 7. Cabe preguntarse qué cuerpo podría ser este glucosil-X, y discutir su posible estructura, como un antecedente necesario para abordar experimentalmente el problema. Desde luego, debemos pensar en que para producir el glucosil-X se requiere energía, la que podría provenir directa o indirectamente del ATP, de acuerdo con lo expresado en el párrafo 9. 6.

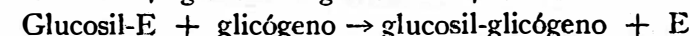
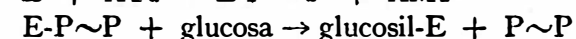
En conformidad con los datos generales acerca de la utilización del ATP en reacciones de síntesis, se podrían imaginar las siguientes posibilidades:

(i) Se formaría primeramente un enlace fosfórico con el fermento, reemplazándose luego este fosfato por glucosa, y en una etapa posterior se constituiría el enlace glucosídico. Las reacciones pueden formularse en las ecuaciones siguientes, donde E representa la enzima:

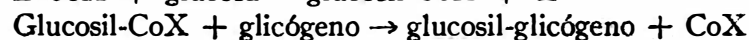
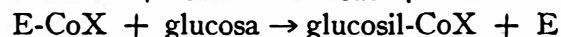
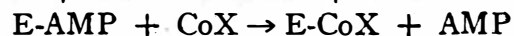
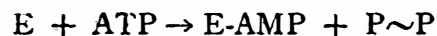


Este mecanismo sería similar a los propuestos para explicar la biosíntesis de la glutamina y de la glutamil-cisteína (Webster y Varner, 1954) así como la del glutatión a expensas de glutamil-cisteína y glicina (Snoke, 1953; Snoke y Bloch, 1955).

(ii) Un segundo mecanismo podría ser semejante al que Maas y Novelli (1953) han elucidado en el caso de la síntesis del ácido pantoténico, obtenida por condensación del ácido pantoico y la β -alanina en una reacción catalizada por extractos de *E. coli*. En esta reacción se liberaría pirofosfato durante el proceso y podríamos representarla en las ecuaciones siguientes, en las cuales $P \sim P$ representa el pirofosfato inorgánico:



(iii) En un tercer mecanismo hipotético de intervención del ATP, se podría formar, como en el caso de la activación del acetato por medio de un fermento de levadura (Jones, Lipmann, Hilz y Lynen, 1953), un enlace de la enzima con el ácido adenílico, liberando pirofosfato en esta etapa inicial. El ácido adenílico sería reemplazado por una sustancia intermedia que desempeñaría la función de cofermento (CoX) que se podría unir a la glucosa, creándose así un enlace glucosídico que por transglucosidación transferiría la molécula de glucosa al residuo de glicógeno:



En estas reacciones hipotéticas, el glucosil-E y el glucosil-CoX, de las reacciones anteriores corresponderían al glucosil-X del esquema propuesto (Fig. 32).

Las posibilidades analizadas tienen una base en reacciones análogas de biosíntesis, de modo que es aconsejable ensayarlas experimentalmente en un primer intento. Es evidente que se pueden imaginar otras variantes de estas reacciones, pero aún no existen los modelos experimentales que las sustenten.

Con respecto a la naturaleza del glucosil-X, hemos pensado en la posibilidad de que corresponda al uridildifosfoglucoído (UDPG), el cual podría ceder el grupo glucósilo a los extremos no reductores del glicógeno, produciéndose de esta manera el alargamiento de las cadenas terminales del polisacárido. La función de dador de glucosa que tendría el UDPG ha sido sugerida por Buchanan, Bassham, Benson, Bradlay, Calvin, Daus, Goodman, Hayes, Lynch, Norris y Wilson (1952) y por Kalckar (1954), y demostrada recientemente en la biosíntesis de sacarosa (Cardini, Leloir y Chiriboga, 1955) y de sacarosafosfato (Leloir y Cardini, 1955).

Por el momento, nuestra suposición es sólo una hipótesis de trabajo, cuya confirmación experimental revestiría el más alto interés, pues permitiría explicar algunos de los problemas que plantea el metabolismo glucídico, analizados ya en párrafos anteriores.

REFERENCIAS

- ABRAHAM, S., CHAIKOFF, I. L. y HAS-
SID, W. Z.—J. Biol. Chem. **195**: 567,
1952.
- ABRAHAM, S., HILL, R. y CHAIKOFF,
I. L.—Cancer Research **15**: 177, 1955.
- ADLER, E., CALVET, F. y GÜNTHER,
G.—Z. f. physiol. Chem. **249**: 40,
1937.
- AEBI, H.—Helv. Physiol. Acta **10**: 184,
1952.
- AEBI, H.—Helv. Physiol. Acta **11**: 96,
1953.
- ALLEN, A., FRIEDMANN, B. y WEIN-
HOUSE, S.—J. Biol. Chem. **212**: 921,
1955.
- ANDERSON, L. y PLAUT, G. W. E., en:
Respiratory Enzymes. Minneapolis,
Burgess Publishing Co., 1949. Pág. 71.
- ANKER, H. S.—J. Biol. Chem. **194**: 177,
1952.
- BAKER, Z.—Biochem. J. **32**: 332, 1937.
- BARANOWSKI, T.—J. Biol. Chem. **180**:
535, 1949.
- BARKER, S. B. y SUMMERSON, W. H.—
J. Biol. Chem. **138**: 535, 1941.
- BAUFAY, H. y DUVE, CH. DE.—Bull.
Soc. Chim. Biol. **36**: 1525, 1954.
- BECK, L. V.—Proc. Soc. Exptl. Biol.
Med. **49**: 435, 1942.
- BELITZER, V. A.—Enzymologia **6**: 1,
1939.
- BELOFF-CHAIN, A., CHAIN, E. B., BO-
VET, D., POCCHIARI, F., CATANZARO,
R. y LONGINOTTI, L.—Biochem. J.
54: 529, 1953.
- BELOFF-CHAIN, A., CATANZARO, R.,
CHAIN, E. B., MASI, I., POCCHIARI,
F. y ROSSI, C.—Proc. Royal Soc.
143: 481, 1955.
- BENDALL, J. R. y LEHMANN, H.—Na-
ture (London) **148**: 538, 1941.
- BENDALL, J. R. y LEHMANN, H.—Bio-
chem. J. **36**: xiv, 1942.
- BERNARD, C.—Nouvelle fonction du
foie. Paris, Baillière, 1853.
- BERNFELD, P.—Adv. Enzymol. **12**: 379,
1951.
- BLOCH, K.—Ann. Rev. Biochem. **21**:
273, 1952.
- BLOOM, B. y STETTEN, JR., D.—J. Am.
Chem. Soc. **75**: 5446, 1953.
- BLOOM, B. y STETTEN, JR., D.—J. Biol.
Chem. **212**: 555, 1955.
- BLOOM, B., STETTEN, M. E. y STETTEN,
JR., D.—J. Biol. Chem. **204**: 681,
1953.
- BOLLMAN, J. L. y MANN, F. C.—Am.
J. Physiol. **96**: 683, 1931.
- BOLLMAN, J. L., MANN, F. C. y MA-
GATH, T. B.—Am. J. Physiol. **74**:
238, 1925.
- BOYER, P. D. y SEGAL, H. L., en: The
Mechanism of Enzyme Action. Bal-
timore, Johns Hopkins Press, 1954.
Pág. 520.
- BOYLAND, E. y BOYLAND, M. E.—Bio-
chem. J. **32**: 321, 1938.

- BOYLE, P. J. y CONWAY, E. J.—*J. Physiol.* **100**: 1, 1941.
- BRODIE, A. F. y LIPMANN, F.—*J. Biol. Chem.* **212**: 677, 1955.
- BUCHANAN, J. G., BASSHAM, J. A., BENSON, A. A., BRADLEY, D. F., CALVIN, M., DAUS, L. L., GOODMAN, M., HAYES, P. M., LYNCH, V. H., NORRIS, L. T. y WILSON, A. T., en: *Phosphorus Metabolism*. Vol. II. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1952. Pág. 440.
- BUCHANAN, J. M., HASTING, A. B. y NESBETT, F. B.—*J. Biol. Chem.* **150**: 413, 1943.
- BUCHANAN, J. M., HASTINGS, A. B. y NESBETT, F. B.—*J. Biol. Chem.* **180**: 435, 1949a.
- BUCHANAN, J. M., HASTINGS, A. B. y NESBETT, F. B.—*J. Biol. Chem.* **180**: 447, 1949b.
- BURK, D., BEHRENS, O. K. y SUGIURA, K.—*Cancer Research* **1**: 732, 1941.
- CALVIN, M.—*Federation Proc.* **13**: 697, 1954.
- CARDINI, C. E., LOLOIR, L. F. y CHIRIBOGA, J.—*J. Biol. Chem.* **214**: 149, 1955.
- CHAIKOFF, I. L., MACLEOD, J. J. R., MARKOWITZ, J. y SIMPSON, W. W.—*Am. J. Physiol.* **74**: 36, 1925.
- CHAMBERS, W. H. y DEUEL, JR., H. J.—*J. Biol. Chem.* **65**: 21, 1925.
- CHERNICK, S. S. y CHAIKOFF, I. L.—*J. Biol. Chem.* **188**: 389, 1951.
- CHIU, C. Y. y NEEDHAM, D. M.—*Biochem. J.* **46**: 114, 1950.
- CONWAY, E. J.—*Nature, London* **150**: 461, 1942.
- CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **70**: 577, 1926.
- CORI, C. F., en: *A Symposium on Respiratory Enzymes*, Madison, The University of Wisconsin Press, 1942. Pág. 175.
- CORI, C. F. y CORI, G. T.—*J. Biol. Chem.* **76**: 755, 1928.
- CORI, C. F. y CORI, G. T.—*J. Biol. Chem.* **81**: 389, 1929.
- CORI, C. F., CORI, G. T. y GREEN, A. A.—*J. Biol. Chem.* **151**: 39, 1943.
- CORI, C. F. y SHINE, W. M.—*J. Biol. Chem.* **114**: xxi, 1936.
- CORI, G. T., COLOWICK, S. P. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **127**: 771, 1939.
- CORI, G. T. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **135**: 733, 1940.
- CORI, G. T. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **151**: 57, 1943.
- CORI, G. T. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **199**: 661, 1952.
- CORI, G. T., CORI, C. F. y SCHMIDT, G.—*J. Biol. Chem.* **129**: 629, 1939.
- CORI, G. T. y GREEN, A. A.—*J. Biol. Chem.* **151**: 31, 1943.
- CORI, G. T. y LARNER, J.—*J. Biol. Chem.* **188**: 17, 1951.
- CORI, G. T., OCHOA, S., SLEIN, M. W. y CORI, C. F.—*Biochim. Biophys. Acta* **7**: 304, 1951.
- CORI, G. T. y SLEIN, M. W.—*Federation Proc.* **6**: 245, 1947.
- CORI, O. y LIPMANN, F.—*J. Biol. Chem.* **194**: 417, 1952.
- CRABTREE, H. G.—*Biochem. J.* **23**: 536, 1929.
- CRAIG, F. N.—*J. Biol. Chem.* **150**: 209, 1943.
- CREMER, M.—*Münch. med. Wochschr.* **44**: 944, 1902.
- CROSS, M. C. A. y HOLMES, E.—*Brit. J. Exp. Path.* **18**: 370, 1937.
- CROSS, R. J., TAGGART, J. V., COVO, G. A. y GREEN, D. E.—*J. Biol. Chem.* **177**: 655, 1949.
- CRUZ-COKE, E., en: *Niemeyer (1942)*, prólogo.
- CRUZ-COKE, E., NIEMEYER, H. y FERNÁNDEZ-POPELAIRE, J.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **2**: 15, 1944.
- CRUZ-COKE, E., NIEMEYER, H. y FIGUEROA, E.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **11**: 2, 1954.
- CRUZ-COKE, E., NIEMEYER, H. y MA-

- RICH, M.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **4**: 14, 1947.
- DARLINGTON, W. A. y QUASTEL, J. H.—*Arch. Biochem. Biophys.* **43**: 194, 1953.
- DEANE, M. W., NESBETT, F. B., BUCHANAN, J. M. y HASTINGS, A. B.—*J. Cell. Comp. Physiol.* **30**: 255, 1947.
- DEUEL, JR., H. J., MACKAY, E. M., JEWEL, P. W., GULICK, M. G. y GRUNEWALD, C. F.—*J. Biol. Chem.* **101**: 301, 1933.
- DEUEL, JR., H. J. y MOREHOUSE, M. G.—*Adv. Carbohydrate Chem.* **2**: 119, 1946.
- DICKENS, F.—*Biochem. J.* **32**: 1626, 1938a.
- DICKENS, F.—*Biochem. J.* **32**: 1636, 1938b.
- DICKENS, F. y GLOCK, G. E.—*Biochem. J.* **50**: 81, 1951.
- DICKENS, F. y GREVILLE, G. D.—*Biochem. J.* **26**: 1546, 1932.
- DICKENS, F. y GREVILLE, G. D.—*Biochem. J.* **27**: 832, 1933.
- DICKENS, F. y SIMER, F.—*Biochem. J.* **24**: 1301, 1930.
- DICKENS, F. y SIMER, F.—*Biochem. J.* **25**: 985, 1931.
- DIXON, K. C.—*Biochem. J.* **44**: 187, 1949.
- DOUNCE, A. L., BARNETT, S. R. y BEYER, G. T.—*J. Biol. Chem.* **185**: 769, 1950.
- DOUNCE, A. L. y BEYER, G. T.—*J. Biol. Chem.* **173**: 159, 1948.
- DRURY, D. R. y SALTER, W. T.—*Am. J. Physiol.* **107**: 406, 1934.
- DUVE, CH. DE, BERTHET, J., HERS, H. G. y DUPRET, L.—*Bull. Soc. Chim. Biol.* **31**: 1242, 1949.
- EDSON, N. L.—*Biochem. J.* **30**: 1855, 1936a.
- EDSON, N. L.—*Biochem. J.* **30**: 1862, 1936b.
- ELLIOT, K. A. C., GREIG, M. E. y BENNOY, M. P.—*Biochem. J.* **31**: 1003, 1937.
- FANTL, P., LINCOLN, G. P. y NELSON, J. F.—*Biochem. J.* **48**: 96, 1951.
- FANTL, P. y ROME, M. N.—*Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **23**: 21, 1945.
- FAVARGER, P. y GERLACH, J.—*Helv. Physiol. Acta* **12**: C70, 1954.
- FELTS, J. M., CHAIKOFF, I. L. y OSBORN, M. J.—*J. Biol. Chem.* **191**: 683, 1951.
- FLINK, E. B., HASTINGS, A. B. y LOWRY, J. K.—*Am. J. Physiol.* **163**: 598, 1950.
- FRUTON, J. S. y SIMMONDS, S.—*General Biochemistry*. New York, John Wiley and Sons, 1953.
- GEMMILL, C. L.—*Physiol. Rev.* **22**: 32, 1942.
- GEMMILL, C. L. y HOLMES, E. G.—*Biochem. J.* **29**: 338, 1935.
- GILL, P. M. y LEHMANN, H.—*Biochem. J.* **33**: 1151, 1939.
- GODA, T.—*Biochem. Z.* **294**: 259, 1937.
- GODA, T.—*Biochem. Z.* **297**: 134, 1938.
- GOMORI, G.—*J. Biol. Chem.* **148**: 139, 1943.
- GREEN, A. A. y CORI, G. T.—*J. Biol. Chem.* **151**: 21, 1943.
- GREEN, D. E., en: *Respiratory Enzymes*. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1949. Pág. 201.
- GREIG, M. E., MUNRO, M. P. y ELLIOT, K. A. C.—*Biochem. J.* **33**: 443, 1939.
- GRIFFITHS, J. P. y WATERS, E. T.—*Am. J. Physiol.* **117**: 34, 1936.
- GUADARRAMA, F.—*Influencia del 2,4-dinitrofenol sobre el consumo de oxígeno de diversos tejidos de rata*. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1955.
- GUNSALUS, I. C.—*Federation Proc.* **13**: 715, 1954.

- GUZMÁN-BARRÓN, E. S.—*Adv. Enzymol.* **3**: 191, 1943.
- GUZMÁN-BARRÓN, E. S., en: *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*. New York, Academic Press Inc., 1952. Pág. 471.
- HARDING, V. J., GRANT, G. A. y GLAISTER, D.—*Biochem. J.* **28**: 257, 1934.
- HARRISON, D. C.—*Biochem. J.* **26**: 785, 1932.
- HASTINGS, A. B. y BUCHANAN, J. M.—*Proc. Nat. Acad. Sci.* **28**: 478, 1942.
- HASTINGS, A. B., TENG, C. T., NESBETT, F. B. y SINEX, F. M.—*J. Biol. Chem.* **194**: 69, 1952.
- HERRERA, O.—Influencia de la alimentación e interferencia de las hormonas gonadales en la producción de lesiones hepáticas. Santiago, Universidad de Chile, 1945.
- HERS, H. G.—*J. Biol. Chem.* **214**: 373, 1955.
- HERS, H. G., BERTHET, J., BERTHET, L. y DUVE, CH. DE.—*Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**: 21, 1951.
- HERS, H. G. y DUVE, CH. DE.—*Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**: 20, 1950.
- HERS, H. G. y KUSAKA, T.—*Biochim. Biophys. Acta* **11**: 427, 1953.
- HIMWICH, H. E., FAZIKAS, J. F., BARKER, S. B. y HURBURT, M. M.—*Am. J. Physiol.* **110**: 348, 1934.
- HIMWICH, H. E., KOSKOFF, Y. D. y NAHUM, L. H.—*J. Biol. Chem.* **85**: 571, 1930.
- HOLMES, E. G.—*Ann. Rev. Biochem.* **3**: 381, 1934.
- HOLMES, E. y LEHMANN, H.—*Brit. J. Exp. Path.* **21**: 196, 1940.
- HORECKER, B. L.—*Federation Proc.* **13**: 711, 1954.
- HORECKER, B. L., GIBBS, M., KLENOW, H. y SMYRNIOTIS, P. Z.—*J. Biol. Chem.* **207**: 393, 1954.
- HORECKER, B. L. y SMYRNIOTIS, P. Z.—*J. Biol. Chem.* **193**: 371, 1951.
- HORECKER, B. L. y SMYRNIOTIS, P. Z.—*J. Am. Chem. Soc.* **74**: 2123, 1952.
- HORECKER, B. L. y SMYRNIOTIS, P. Z.—*J. Am. Chem. Soc.* **75**: 2021, 1953.
- HORECKER, B. L., SMYRNIOTIS, P. Z., HIATT, H. H. y MARKS, P. A.—*J. Biol. Chem.* **212**: 827, 1955.
- HORECKER, B. L., SMYRNIOTIS, P. Z. y KLENOW, H.—*J. Biol. Chem.* **205**: 661, 1953.
- HORECKER, B. L., SMYRNIOTIS, P. Z. y SEEGMILLER, J. E.—*J. Biol. Chem.* **193**: 383, 1951.
- HULLIN, R. P. y NOBLE, R. L.—*Biochem. J.* **55**: 289, 1953.
- HUNTER, JR., F. E., en: *Phosphorus Metabolism*. Vol. I. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951. Pág. 297.
- HUNTER, JR., F. E. y SPECTOR, S.—*Federation Proc.* **10**: 201, 1951.
- IZUME, S. y LEWIS, H. B.—*J. Biol. Chem.* **71**: 51, 1926-27.
- JALIL, J.—Influencia de sustancias modificadoras del metabolismo del fósforo en la respiración de mitocondrias de hígado. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1952.
- JOHNSON, R. B. y ACKERMANN, W. W.—*J. Biol. Chem.* **200**: 263, 1953.
- JONES, M. E., LIPMANN, F., HILZ, H. y LYNEN, F.—*J. Am. Chem. Soc.* **75**: 3285, 1953.
- KALCKAR, H. M., en: *The Mechanism of Enzyme Action*. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1954. Pág. 675.
- KAMINGA, C. E., WILLEBRANDS, H. F., GROEN, J. y BLICKMAN, J. R.—*Science* **111**: 30, 1950.
- KAPLAN, N., en: *Phosphorus Metabolism*. Vol. I. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951. Pág. 428.
- KAPLAN, N. y GREENBERG, D. M.—*J. Biol. Chem.* **150**: 497, 1943.
- KATZ, J., ABRAHAM, S., HILL, R. y

- CHAIKOFF, I. L.—*J. Am. Chem. Soc.* **76**: 2277, 1954.
- KATZ, J., ABRAHAM, S., HILL, R. y CHAIKOFF, I. L.—*J. Biol. Chem.* **214**: 853, 1955.
- KAUFMANN, M.—*Arch. physiol. norm. et path.* **8**: 151, 1896.
- KAUSCH, W.—*Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* **39**: 219, 1897.
- KELLER, P. J. y CORI, G. T.—*Biochim. Biophys. Acta* **12**: 235, 1953.
- KISCH, B.—*Biochem. Z.* **271**: 420, 1934.
- KJERULF-JENSEN, K.—*Acta Physiol. Scand.* **4**: 225, 1942a.
- KJERULF-JENSEN, K.—*Acta Physiol. Scand.* **4**: 249, 1942b.
- KNOX, W. E., NOYCE, B. N. y AUERBACH, V. H.—*J. Biol. Chem.* **176**: 117, 1948.
- KOSTERLITZ, H. W. y RITCHIE, C. M.—*Biochem. J.* **37**: 618, 1943.
- KREBS, H. A.—*Z. f. phys. Chem.* **217**: 191, 1933.
- KREBS, H. A.—*Biochem. J.* **29**: 1620, 1935.
- KREBS, H. A.—*Adv. Enzymol.* **3**: 191, 1943.
- KREBS, H. A.—*Bull. Johns Hopkins Hosp.* **95**: 19, 1954.
- KREBS, H. A. y EGGLESTON, L. V.—*Biochem. J.* **44**: vii, 1949.
- KREBS, H. A., EGGLESTON, L. V. y TERNER, C.—*Biochem. J.* **48**: 530, 1951.
- KRIMSKY, I. y RACKER, E.—*J. Biol. Chem.* **198**: 721, 1952.
- LANDAU, B. R., HASTINGS, A. B. y NESBETT, F. B.—*J. Biol. Chem.* **214**: 525, 1955.
- LANG, S., GOLDSTEIN, M. y LEVINE, R.—*Am. J. Physiol.* **177**: 447, 1954.
- LARDY, H. A., en: *Respiratory Enzymes*, Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1949. Pág. 179.
- LARDY, H. A. y WELLMAN, H.—*J. Biol. Chem.* **195**: 215, 1952.
- LARDY, H. A. y WELLMAN, H.—*J. Biol. Chem.* **201**: 357, 1953.
- LARDY, H. A., WIEBELHAUS, V. D. y MANN, K. M.—*J. Biol. Chem.* **187**: 325, 1950.
- LARDY, H. A. y ZIEGLER, J. A.—*J. Biol. Chem.* **159**: 343, 1945.
- LARNER, J.—*J. Biol. Chem.* **202**: 491, 1953.
- LEHMANN, H.—*Nature (London)* **141**: 470, 1938.
- LEHNINGER, A. L.—*J. Biol. Chem.* **190**: 345, 1951.
- LELOIR, L. F., en: *Phosphorus Metabolism*. Vol. I. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951. Pág. 67.
- LELOIR, L. F. y CARDINI, C. E.—*J. Biol. Chem.* **214**: 157, 1955.
- LEUTHARDT, F. y TESTA, E.—*Helv. Chim. Acta* **33**: 1919, 1950.
- LEUTHARDT, F. y TESTA, E.—*Helv. Chim. Acta* **34**: 931, 1951.
- LEUTHARDT, F., TESTA, E. y WOLF, H. P.—*Helv. Chim. Acta* **36**: 227, 1953.
- LEUTHARDT, F. y WOLF, H. P.—*Helv. Chim. Acta* **37**: 1734, 1954.
- LIFSON, N., LORBER, V., SAKAMI, W. y WOOD, H. G.—*J. Biol. Chem.* **176**: 1263, 1948.
- LIPMANN, F.—*Nature (London)* **138**: 588, 1936.
- LIPMANN, F.—*Science* **120**: 855, 1954.
- LIPMANN, F. y KAPLAN, N. O.—*Ann. Rev. Biochem.* **17**: 267, 1947.
- LOHMANN, K.—*Biochem. Z.* **262**: 137, 1933.
- LONG, C.—*Biochem. J.* **49**: xxxiv, 1951.
- LONGENECKER, H. E.—*Biol. Symposia* **5**: 99, 1941.
- LOOMIS, W. F. y LIPMANN, F.—*J. Biol. Chem.* **173**: 807, 1948.
- LORBER, V., COOK, M. y MEYER, J.—*J. Biol. Chem.* **181**: 475, 1949.
- LORBER, V., LIFSON, N., WOOD, H. G. y SAKAMI, W.—*Am. J. Physiol.* **155**: 452 P, 1948.
- LORBER, V., LIFSON, N., WOOD, H. G.,

- SAKAMI, W. y SHREEVE, W. W.—*J. Biol. Chem.* **183**: 517, 1950.
- LORBER, V., LIFSON, N., SAKAMI, W. y WOOD, H. G.—*J. Biol. Chem.* **183**: 531, 1950.
- LUNDGAARD, E.—*Biochem. Z.* **264**: 209, 1933.
- LÜTHJE, H.—*Deut. Arch. klin. Med.* **80**: 98, 1904.
- MAAS, W. K. y NOVELLI, G. D.—*Arch. Biochem. Biophys.* **43**: 236, 1953.
- McHENRY, E. W. y CORNETT, M. L.—*Vitamins and Hormones* **2**: 1, 1944.
- MACKEY, E. M., CARNE, H. O. y WICK, A. N.—*J. Biol. Chem.* **133**: 59, 1940.
- MACLEOD, J. J. R. y MARKOWITZ, J.—*Tr. A. Am. Physicians* **41**: 147, 1926.
- MACLEOD, J. J. R. y PEARCE, R. G.—*Am. J. Physiol.* **33**: 378, 1914.
- MANDEL, A. R. y LUSK, G.—*Am. J. Physiol.* **16**: 129, 1906.
- MANN, F. C.—*Medicine* **6**: 419, 1927.
- MANN, F. C. y MAGATH, T. B.—*Arch. Int. Med.* **30**: 171, 1922.
- MARSH, M. E.—*J. Nutrit.* **13**: 109, 1937.
- MARTIUS, C. y LYNEN, F.—*Adv. Enzymol.* **10**: 167, 1950.
- MASORO, E. J., CHAIKOFF, I. L., CHERNICK, S. S. y FELTS, J. M.—*J. Biol. Chem.* **185**: 845, 1950.
- MENDEL, B.—*Klin. Wochschr.* **8**: 169, 1929.
- MENDEL, B., BAUCH, M. y STRELITZ, F.—*Klin. Wochschr.* **10**: 118, 1931.
- MENDEL, B., STRELITZ, F. y NUNDELL, D.—*Nature (London)* **141**: 288, 1938.
- MEUTÉMEDIAN, A. G.—*Recherche sur l'isophosphorylase et la formation des polysaccharides ramifiés*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de Ginebra, 1954.
- MEYERHOF, O.—*Pflügers Arch. ges. Physiol.* **182**: 284, 1920.
- MEYERHOF, O. y GREEN, H.—*J. Biol. Chem.* **178**: 655, 1949.
- MEYERHOF, O. y LOHMANN, K.—*Biochem. Z.* **171**: 421, 1926.
- MINKOWSKI, O.—*Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* **21**: 41, 1886.
- MINKOWSKI, O.—*Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.* **31**: 85, 1893.
- MIRSKI, A.—*Biochem. J.* **36**: 232, 1942.
- MURSCHEHAUSER, H.—*Pflügers Arch. ges. Physiol.* **139**: 255, 1911.
- NASH, T. P.—*Physiol. Rev.* **7**: 385, 1927.
- NEEDHAM, J. y LEHMANN, H.—*Biochem. J.* **31**: 1210, 1937a.
- NEEDHAM, J. y LEHMANN, H.—*Biochem. J.* **31**: 1913, 1937b.
- NEEDHAM, J. y NOWINSKY, W. W.—*Biochem. J.* **31**: 1165, 1937.
- NIELSEN, S. O. y LEHNINGER, A. L.—*J. Am. Chem. Soc.* **76**: 3860, 1954.
- NIEMEYER, H.—Contribución al estudio del metabolismo de la célula hepática. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1942.
- NIEMEYER, H.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **8**: 155, 1951.
- NIEMEYER, H., CRANE, R. K., KENNEDY, E. P. y LIPMANN, F.—*Federation Proc.* **10**: 229, 1951.
- NIEMEYER, H., CRANE, R. K., KENNEDY, E. P. y LIPMANN, F.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **10**: 54, 1953.
- NIEMEYER, H. y FIGUEROA, E.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **11**: 23, 1954.
- NIEMEYER, H. y FIGUEROA, E.—*Arch. Biochem. Biophys.* **54**: 135, 1955a.
- NIEMEYER, H. y FIGUEROA, E.—*Acta Physiol. Latinoam.* 1955b, en prensa.
- NIEMEYER, H., FIGUEROA, E. y FIGUEROA, S.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **11**: 3, 1954.
- NIEMEYER, H., FIGUEROA, E., MARICH, M., CAMUS, E. y FIGUEROA, S.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **10**: 22, 1953.

- NIEMEYER, H. y JALIL, J.—*Biochim. Biophys. Acta* **12**: 492, 1953.
- NIEMEYER, H. y JALIL, J.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **11**: 15, 1954.
- NIEMEYER, H. y LIRA, E.—*Bol. Soc. Biol. Santiago, Chile* **4**: 73, 1947.
- OCHOA, S.—*Physiol. Rev.* **31**: 56, 1951.
- OCHOA, S. y STERN, J. R.—*Ann. Rev. Biochem.* **21**: 547, 1952.
- OLSEN, N. S., HEMINGWAY, A. y NIER, A. O.—*J. Biol. Chem.* **148**: 611, 1943.
- OLSON, R. E.—*Cancer Research* **11**: 571, 1951.
- OLSON, R. E., ROBSON, J. S., RICHARDS, H. y HIRSCH, E. G.—*Federation Proc.* **9**: 211, 1950.
- ORR, J. W. y STICKLAND, L. H.—*Biochem. J.* **35**: 479, 1941.
- OSTERN, P., GUTHKE, J. A. y TERSZAKOWEC, J.—*Z. f. physiol. Chem.* **243**: 9, 1936.
- OSTERN, P., HERBERT, D. y HOLMES, E.—*Biochem. J.* **33**: 1858, 1939.
- PATTERSON, S. W. y STARLING, E. H.—*J. Physiol.* **47**: 137, 1913-14.
- PEISS, C. N. y FIELD, J.—*J. Biol. Chem.* **175**: 49, 1948.
- PETERS, J. P. y VAN SLYKE, D.—*Quantitative Clinical Chemistry. Interpretations. Vol. I.* Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1946.
- PLAUT, G. W. E. y PLAUT, K. A.—*J. Biol. Chem.* **199**: 141, 1942.
- PLAZA DE LOS REYES, M.—*Metabolismo de los Acidos Nucleicos*. Santiago, Universidad de Chile, 1955.
- POPJÁK, G., en: *Isotopes in Biochemistry*, Ciba Foundation Conferences. London, J. & A. Churchill, Ltda. 1951. Pág. 258.
- POTTER, V. R. y RECKNAGEL, R. O., en: *Phosphorus Metabolism. Vol. I.* Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951. Pág. 377.
- QUASTEL, J. H.—*Physiol. Rev.* **19**: 422, 1939.
- QUASTEL, J. H. y WHEATLEY, A. H. M.—*Biochem. J.* **27**: 1753, 1933.
- RABINOVITZ, M., STULBERG, M. P. y BOYER, P. D.—*Science* **114**: 641, 1951.
- RACKER, E.—*Adv. Enzymol.* **15**: 141, 1954.
- RACKER, E., en: *The Mechanism of Enzyme Action*. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1954. Pág. 464.
- RACKER, E., HABA, G. DE LA, y LEDER, I.—*J. Am. Chem. Soc.* **75**: 1010, 1953.
- RAPOPORT, S., LEVA, E. y GUEST, G. M.—*J. Biol. Chem.* **149**: 57, 1943.
- REINECKE, R. M.—*Am. J. Physiol.* **136**: 167, 1942.
- REINECKE, R. M.—*Am. J. Physiol.* **140**: 276, 1943.
- REINECKE, R. M.—*Am. J. Physiol.* **141**: 669, 1944.
- RENOUD, A. E., HASTINGS, A. B. y NESBETT, F. B.—*J. Biol. Chem.* **209**: 687, 1954.
- RENOUD, A. E., TENG, C. T., NESBETT, F. B. y HASTINGS, A. B.—*J. Biol. Chem.* **204**: 533, 1953.
- RICHARDSON, H. B., SHORR, E. y LOEBEL, R. O.—*J. Biol. Chem.* **86**: 551, 1930.
- ROBERTS, S. y SAMUELS, L. T.—*Am. J. Physiol.* **142**: 240, 1944.
- RODNEY, G. y GARNER, R. L.—*J. Biol. Chem.* **125**: 209, 1938.
- RÖHMANN, F.—*Arch. ges. Physiol.* **39**: 21, 1886.
- ROJAS-VILLEGAS, F.—Contribución al estudio del metabolismo del corazón. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1936.
- ROSENTHAL, F.—*Ergebn. d. inn. Med. u. Klinik.* **33**: 63, 1928.

- ROSENTHAL, O.—*Biochem. Z.* **207**: 263, 1929.
- ROSENTHAL, O.—*Biochem. Z.* **227**: 352, 1930.
- ROSENTHAL, O.—*Biochem. J.* **31**: 1710, 1937.
- RUDNEY, H.—*Arch. Biochem. Biophys.* **23**: 67, 1949.
- RUSSELL, J. A.—*Am. J. Physiol.* **136**: 95, 1942.
- RUSSELL, J. A. y WILHELMI, A. E.—*J. Biol. Chem.* **140**: 747, 1941.
- SCOTT, D. B. M. y COHEN, S. S.—*J. Biol. Chem.* **188**: 509, 1951.
- SEEGMILLER, J. E. y HORECKER, B. L.—*J. Biol. Chem.* **194**: 261, 1952.
- SHAPIRO, B. y WERTHEIMER, E.—*J. Biol. Chem.* **173**: 725, 1948.
- SHAPIRO, I.—*J. Biol. Chem.* **108**: 373, 1935.
- SHORR, E., LOEBEL, R. O. y RICHARDSON, H. B.—*J. Biol. Chem.* **86**: 529, 1936.
- SHREEVE, W. W.—*J. Biol. Chem.* **195**: 1, 1952.
- SIBLEY, J. A. y LEHNINGER, A. L.—*J. Biol. Chem.* **177**: 859, 1949.
- SIEKEVITZ, P. y POTTER, V. R.—*J. Biol. Chem.* **201**: 1, 1953.
- SLEIN, M. W., CORI, G. T. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **186**: 763, 1950.
- SNOKE, J. E.—*J. Am. Chem. Soc.* **75**: 4872, 1953.
- SNOKE, J. E. y BLOCH, K.—*J. Biol. Chem.* **213**: 825, 1955.
- SOLOMON, A. K., VENNESLAND, B., KLEMPERER, F. W., BUCHANAN, J. M. y HASTINGS, A. B.—*J. Biol. Chem.* **140**: 171, 1941.
- SOSKIN, S.—*Am. J. Physiol.* **81**: 382, 1927.
- SOSKIN, S.—*J. Nutrition* **3**: 99, 1930.
- SOSKIN, S., ESSEX, H. E., HERRICK, J. F. y MANN, F. C.—*Am. J. Physiol.* **124**: 558, 1938.
- SOSKIN, S. y LEVINE, R.—*Am. J. Physiol.* **120**: 761, 1937.
- SOSKIN, S. y LEVINE, R.—*Metabolismo de los hidratos de carbono*. Madrid, Aguilar, S. A. de Ediciones, 1950.
- SOSKIN, S., LEVINE, R. y TAUBENHAUS, M.—*Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **42**: 689, 1939.
- SOSKIN, S., LEVINE, R. y TAUBENHAUS, M.—*Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **44**: 257, 1940.
- STADIE, W. C., LUCKENS, F. D. W. y ZAPP, J. A.—*J. Biol. Chem.* **132**: 393, 1940.
- STAUB, A. y VESTLING, C. S.—*J. Biol. Chem.* **191**: 395, 1951.
- STEINBACH, H. B.—*J. Biol. Chem.* **133**: 695, 1940.
- STETTEN, JR., D. y BOXER, G. E.—*J. Biol. Chem.* **155**: 231, 1944.
- STETTEN, M. R. y STETTEN, JR., D.—*J. Biol. Chem.* **213**: 723, 1955.
- STETTEN, M. R. y TOPPER, Y. J.—*J. Biol. Chem.* **203**: 653, 1953.
- STEWART, C. P. y THOMPSON, J. C.—*Biochem. J.* **35**: 245, 1941.
- STICKLAND, L. H.—*Biochem. J.* **35**: 859, 1941.
- STOESZ, P. A. y LEPAGE, G. A.—*J. Biol. Chem.* **180**: 587, 1949.
- STÖHR, R.—*Z. f. physiol. Chem.* **217**: 153, 1953.
- STOTZ, E.—*Adv. Enzymol.* **5**: 129, 1945.
- STOTZ, E., HARRER, C. J., SCHULTZE, M. O. y KING, C. G.—*J. Biol. Chem.* **120**: 129, 1937.
- STRECKER, H. J. y KORKES, S.—*Nature (London)* **168**: 913, 1951.
- STRECKER, H. J. y KORKES, S.—*J. Biol. Chem.* **196**: 769, 1952.
- SÜLLMANN, H.—*Enzymologia* **5**: 372, 1939.
- SUTHERLAND, E. W.—*Federation Proc.* **10**: 256, 1951a.
- SUTHERLAND, E. W.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **54**: 693, 1951b.
- SUTHERLAND, E. W., COLOWICK, S. P. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **140**: 309, 1941.

- SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F.—*J. Biol. Chem.* **188**: 531, 1951.
- SUTHERLAND, E. W. y WOSILAIT, W. D.—*Nature (London)* **175**: 169, 1955.
- SWANSON, M.—*J. Biol. Chem.* **184**: 647, 1950.
- SWICK, R. W. y NAKAO, A.—*J. Biol. Chem.* **206**: 883, 1954.
- TAKANE, R.—*Biochem. Z.* **171**: 403, 1926.
- TAYLOR, J. F., en: *Phosphorus Metabolism*. Vol. I. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1951. Pág. 104.
- TENG, C. T.—*Arch. Biochem. Biophys.* **48**: 409, 1954.
- TIPTON, S. R.—*Am. J. Physiol.* **127**: 710, 1939.
- TIPTON, S. R.—*Am. J. Physiol.* **132**: 74, 1941.
- TOPPER, Y. J. y HASTINGS, A. B.—*J. Biol. Chem.* **179**: 1255, 1949.
- TOPPER, Y. J. y STETTEN, JR., D.—*J. Biol. Chem.* **193**: 149, 1951.
- TUERKISCHER, E. y WERTHEIMER, E.—*J. Physiol.* **100**: 385, 1942.
- UGALDE, F.—*Algunos aspectos metabólicos del hígado de rata en diferentes condiciones experimentales*. Tesis de grado. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1943.
- UTTER, M. F. y KURAHASHI, K.—*J. Biol. Chem.* **207**: 787, 1954a.
- UTTER, M. F. y KURAHASHI, K.—*J. Biol. Chem.* **207**: 821, 1954b.
- UTTER, M. F., KURAHASHI, K. y ROSE, I. A.—*J. Biol. Chem.* **207**: 803, 1954.
- UTTER, M. F. y WOOD, H. G.—*Adv. Enzymol.* **12**: 41, 1951.
- VELICK, S. F., en: *The Mechanism of Enzyme Action*. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1954. Pág. 491.
- VERZÁR, F. y WENNER, V.—*Biochem. J.* **42**: 48, 1948.
- VESTLING, C. S., IRISH, U., HIRSH, A. K. y GRANT, N. H.—*Federation Proc.* **8**: 263, 1949.
- VESTLING, C. S., MILROIE, A. K., IRISH, U. y GRANT, N. H.—*J. Biol. Chem.* **185**: 789, 1950.
- WAINIO, W. W.—*J. Biol. Chem.* **168**: 569, 1947.
- WARBURG, O.—*Métabolisme Cellulaire et Métabolisme des Tumeurs*. Paris, Librairie Félix Alcan, 1928.
- WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.—*Biochem. Z.* **292**: 287, 1937.
- WARBURG, O., CHRISTIAN, W. y GRIESE, A.—*Biochem.* **282**: 157, 1935.
- WARREN, C. O. y EBAUGH, F. G.—*Am. J. Physiol.* **147**: 509, 1946.
- WEBER, G. y CANTERO, A.—*Cancer Research* **15**: 105, 1955.
- WEBSTER, G. C. y VARNER, J. E.—*J. Am. Chem. Soc.* **76**: 633, 1954.
- WEICHSELBAUM, T. E., MARGRAF, H. W. y ELMAN, R.—*Metabolism* **2**: 434, 1953.
- WEINHOUSE, S.—*Cancer Research* **11**: 585, 1951.
- WIERZUCHOWSKI, M. y LING, S. M.—*J. Biol. Chem.* **64**: 697, 1925.
- WITTER, R. F., NEWCOMB, E. H. y STOTZ, E.—*J. Biol. Chem.* **202**: 291, 1953.
- WOLF, H. P. y LEUTHARDT, F.—*Helv. Chim. Acta* **36**: 1463, 1953.
- WOOD, H. G., en: *Isotopes in Biochemistry*, Ciba Foundation Conferences. London, J. & A. Churchill, Ltda., 1951. Pág. 235.
- YATER, W. M., MARKOWITZ, J. y CAHOON, R. F.—*Arch. Int. Med.* **51**: 800, 1933.
- ZAMECNIK, P. C., LOFTFIELD, R. B., STEPHENSON, M. L. y STEELE, J. M.—*Cancer Research* **11**: 592, 1951.
- ZIERLER, K. L., LEVY, R. I. y ANDRES, R.—*Bull. Johns Hopkins Hosp.* **92**: 7, 1953.